

THESES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

par

Maurice METCHE

Ingénieur Chimiste E. N. S. C. T.

Licencié ès-Sciences Physiques

Ingénieur-Docteur

Maitre-Assistant à la Faculté des Sciences

Première Thèse :

Contribution à l'Étude des Pigments Anthocyaniques chez quelques Végétaux

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté

Soutenues le 18 Octobre 1966, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président : M. E. URION

Examineurs : MM. J. BARRIOL

J. NEEL

J. LEVISALLES

THESES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

par

Maurice METCHE

Ingénieur Chimiste E. N. S. C. T.

Licencié ès-Sciences Physiques

Ingénieur-Docteur

Maître-Assistant à la Faculté des Sciences

Première Thèse :

Contribution à l'Étude des Pigments Anthocyaniques chez quelques Végétaux

Deuxième Thèse : **Propositions données par la Faculté**

Soutenues le 18 Octobre 1966, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président : M. E. URION

Examineurs : MM. J. BARRIOL

J. NEEL

J. LEVISALLES



Doyen : M. AUBRY

Assesseur : M. GAY

Doyens Honoraires : MM. CORNUBERT, DELSARTE, URION, ROUBAULT.

Professeurs Honoraires : MM. CRUZE, RAYBAUD, LAFFITTE, LERAY, JULY, LAPORTE, EICHHORN, GODEMENT, DUBREUIL, L. SCHWARTZ, DIEUDONNE, de MALLEMANN, LONGCHAMBON, LETORT, DODE, GAUTHIER, GOUDET, CORNUBERT, OLMER, CHAPELLE, GUERIN, WAHL.

Maîtres de Conférences Honoraires : MM. LIENHART et PIERRET.

Professeurs :

MM.		MM.	
URION	Chimie biologique	MANGENOT	Botanique
DELSARTE	Analyse supérieure	GAYET	Physiologie
ROUBAULT	Géologie	BONVALET	Mécanique appliquée
CAPELLE	Mécanique rationnelle	HADNI	Physique
VEILLET	Biologie animale	°BASTICK	Chimie
BARRIOL	Chimie théorique	DUCHAUFOR	Pédologie
BIZETTE	Physique	GARNIER	Agronomie
GUILLIEN	Electronique	°WEPPE	Minéralogie appliquée
GIBERT	Chimie physique	NEEL	Chimie organique
LEGRAS	Mécanique rationnelle		industrielle
BOLFA	Minéralogie et cristallographie	BERNARD	Géologie appliquée
NICLAUSE	Chimie	°CHAMPIER	Physique
FAIVRE	Physique appliquée	°GAY	Chimie biologique
AUBRY	Chimie générale	STEPHAN	Zoologie
COPPENS	Radiogéologie	°CONDE	Zoologie
DUVAL	Chimie	°WERNER	Botanique
FRUHLING	Physique	EYMARD	Calcul différentiel
HILLY	Géologie		et intégral
LE GOFF	Génie chimique	LEVISALLES	Chimie organique
SUHNER	Physique expérimentale	Mme HERVE	Méthodes mathématiques
CHAPON	Chimie biologique		de la physique
HEROLD	Chimie minérale industrielle	MM.	
B.SCHWARTZ	Exploitation minière	°GOSSE	Mécanique physique
°MALAPRADE	Chimie	FELDEN	Physique

ANNEE SCOLAIRE 1965-1966

°Professeur titulaire à titre personnel



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555020_0032

Maîtres de Conférences

Mme	BASTICK	Chimie M. P. C. (Epinal)
MM.	GUDEFIN	Physique
	ROCCI	Géologie
	VUILLAUME	Psychophysiologie
	FRENTZ	Biologie animale
	HORN	Physique propédeutique
	LAFON	Physique (I. S. I. N.)
	MARI	Chimie (I. S. I. N.)
	AUROUZE	Géologie
	DEVIOT	Physique du solide
	FLECHON	Physique M. P. C.
Melle	HUET	Mathématiques S. P. C. N.
MM.	VIGNES	Métallurgie
	BALESDENT	Thermodynamique chimique appliquée
	BLAZY	Minéralogie appliquée (E. N. S. G.)
	JANOT	Physique M. P. C. (Epinal)
	JACQUIN	Pédologie et chimie agricole
	MAINARD	Physique M. G. P.
	CACHAN	Entomologie appliquée (E. N. S. A.)
	MARTIN	Chimie M. P. C.
	PROTAS	Minéralogie
	N...	Probabilités et statistiques
	N...	Mécanique (I. S. I. N.)
	N...	Mathématiques
	N...	Mécanique expérimentale
	N...	Génie chimique
	N...	Mathématiques M. P. C.
	N...	Mathématiques S. P. C. N.
	N...	Mathématiques appliquées
	N...	Mécanique des fluides (I. S. I. N.)
	N...	Physiologie animale
	N...	Physico-chimie

A MONSIEUR LE DOYEN URION

Professeur à la Faculté des Sciences de Nancy,

Directeur de l'Ecole Supérieure de Brasserie,
de Malterie et de Biochimie Appliquée.

En témoignage de profonde reconnaissance
et respectueuse gratitude pour la haute
bienveillance qu'il m'a toujours témoignée.

A la mémoire de mes parents

A ma femme

A tous les miens

En témoignage d'affection.

AVANT - PROPOS

Les recherches qui font l'objet de cette étude ont été réalisées au Laboratoire de Recherches de l'Ecole Supérieure de Brasserie, de Malterie et de Biochimie Appliquée de la Faculté des Sciences de Nancy.

Elles ont été entreprises à l'instigation de Monsieur le Doyen URION, Professeur à la Faculté des Sciences et Directeur de l'Ecole Supérieure de Brasserie, de Malterie et de Biochimie Appliquée. L'aide morale et le bienveillant intérêt qu'il nous a toujours témoignés ont été d'un réconfortant concours pour la mise au point de notre travail. Ses conseils judicieux et la mise à notre disposition de moyens matériels importants ont facilité nos recherches. Nous sommes heureux de lui rendre hommage et de lui présenter ici, avec nos sincères remerciements, nos sentiments de respectueuse reconnaissance.

Nous tenons à remercier vivement Messieurs les Professeurs BARRIOL, NEEL et LEVISALLES d'avoir bien voulu accepter de faire partie du Jury de cette thèse.

Il nous est agréable d'exprimer notre gratitude à Monsieur le Professeur NICLAUSE qui a mis à notre disposition le matériel de spectrographie I.R. de son laboratoire. Nous sommes particulièrement redevable à Monsieur LEMAIRE de nous avoir fait bénéficier de son expérience dans ce domaine.

Nous remercions beaucoup Monsieur le Professeur GAY qui a bien voulu nous confier un matériel d'enregistrement de radiochromatogrammes.

Nous sommes très reconnaissant à Monsieur PIERRAT, Chimiste-Adjoint au C.N.R.S., dont le dévouement et la compétence ont été d'un précieux concours pour la réalisation matérielle de ce travail.

Nous ne manquerons pas d'adresser aussi nos remerciements à Monsieur HALLUCK qui a été un collaborateur fidèle et dévoué, ainsi qu'à Monsieur NGUYEN pour les nombreux services rendus.

Nous ne voulons pas oublier le personnel du laboratoire et du secrétariat dont nous avons beaucoup apprécié la serviabilité.

INTRODUCTION

La bière, milieu colloïdal par excellence, subit un vieillissement qui aboutit finalement à une floculation. Intermédiairement, elle est le siège d'une évolution interne spontanée qui, après un temps variable, se manifeste par un louche sensible à l'œil que le brasseur appelle "trouble". On admet depuis longtemps que les responsables de ce trouble sont des associations entre protéines et tannins, ou polyphénols, soit qu'elles représentent les éléments mêmes ou des précurseurs qui évoluent spontanément avec le temps. On a incriminé les adsorbats protéiques des polymères des leucoanthocyanes, eux-mêmes introduits par les écorces de l'orge et les cônes de houblon.

L'étude des polyphénols de ces matériaux présente donc un intérêt à la fois fondamental et particulier à la technologie brassicole.

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressé à des structures apparentées aux leucoanthocyanes mais plus simples, sous forme de pigments anthocyaniques.

Choisissant une orge à téguments colorés (variété Violette de Guimalaye), nous avons isolé un pigment anthocyanique et déterminé sa structure.

Nous nous sommes ensuite adressé à des végétaux fortement pigmentés : feuille de chou rouge à maturité, plantules de ce même chou, puis plantules de seigle avec l'avantage, dans ces derniers cas, de pouvoir disposer d'une matière première abondante et à une période quelconque de l'année.

Le choix de deux matériaux aussi différents l'un de l'autre que le seigle et le chou rouge peut paraître disparate à première vue mais se justifie pour plusieurs raisons. En effet, le seigle offrait l'avantage de présenter une pigmentation intense mais transitoire, tandis que le chou rouge est le siège d'une anthocyanogenèse permanente. De plus, les organes végétaux jeunes ont une activité métabolique importante, ce qui facilite l'étude des échanges et des transformations dont sont l'objet les flavonoïdes.

Il était intéressant de vérifier que la biosynthèse des pigments anthocyaniques se fait de manière à peu près identique dans les deux végétaux sous l'influence de la lumière avec les mêmes précurseurs. La nature complémentaire des structures des pigments anthocyaniques du seigle et du chou se prête à la comparaison et permet d'étudier la biogenèse des principaux éléments entrant dans leur constitution : aglycone, sucres, groupements acylés.

C'est cet aspect du problème qui a retenu notre attention et nous a conduit finalement à tenter de réaliser la synthèse des pigments anthocyaniques in vitro.

Notre étude comporte quatre parties :

- 1ère Partie : Méthodes et techniques.
- 2ème Partie : Identification des pigments anthocyaniques des plantules de seigle et de chou.
- 3ème Partie : Préparation des pigments anthocyaniques à partir des flavonols.
- 4ème Partie : Essais sur la biogénèse et la biosynthèse des pigments anthocyaniques du seigle et du chou rouge.

Dans la première partie, nous avons décrit les techniques utilisées en insistant plus particulièrement sur les améliorations que nous avons apportées à quelques-unes des méthodes chromatographiques et électrophorétiques.

La seconde partie a été consacrée à l'identification des pigments anthocyaniques des plantules de seigle et du chou rouge. Nous avons identifié les pigments du seigle à l'exception de l'un d'entre eux dont la structure n'est pas complètement précisée.

La structure des pigments du chou rouge n'était pas connue au moment où nous avons entrepris cette étude. Quelque temps après, HARBORNE a publié un travail important concernant l'identification des pigments du chou; nous avons confirmé ses résultats, déterminé en plus la structure du pigment le plus abondant et montré l'existence de deux autres.

Dans la troisième partie, nous nous sommes proposé de réaliser la synthèse partielle des pigments anthocyaniques à partir des flavonols par réduction électrolytique. Cette méthode simple s'adapte facilement à la préparation de petites quantités de pigments pour des études analytiques.

Nous avons abordé, dans la quatrième partie, l'étude de l'influence de la lumière sur la formation des pigments anthocyaniques dans les plantules de seigle et de chou rouge conjointement à l'incorporation de précurseurs radioactifs. La biogénèse des hétérosides et de leurs dérivés acylés a fait l'objet d'une étude particulière et a été complétée par un essai de biosynthèse des pigments anthocyaniques in vitro.

PREMIERE PARTIE

Méthodes et Techniques

- CHAPITRE I Matière Végétale utilisée pour cette étude.
- culture des plantules.
- CHAPITRE II Extraction des pigments anthocyaniques.
A. Traitement du chou à maturité.
B. Traitement des plantules de chou et de seigle.
a) Extraction des pigments avec le mélange acétone-eau
b) Extraction au méthanol^{1,2}
- CHAPITRE III Techniques de fractionnement chromatographiques.
A. Chromatographie analytique.
a) Chromatographie sur papier
b) Chromatographie sur couches minces
1) Préparation des chromatoplaques
2) Utilisation des chromatoplaques
B. Chromatographie préparative.
a) chromatographie sur colonne
b) chromatographie sur papier épais
c) chromatographie sur couches épaisses
C. Chromatographie quantitative.
a) chromatographie sur papier et photométrie
b) chromatographie sur couches minces et photométrie
- CHAPITRE IV Techniques de fractionnement par électrophorèse.
A. Electrophorèse sur papier.
B. Electrophorèse sur couches minces.
- CHAPITRE V Techniques radiochimiques.
A. Préparation des plantules.
B. Autoradiographie.
C. Mesure de la radioactivité.
-

PREMIERE PARTIE

METHODES ET TECHNIQUES

CHAPITRE I

MATIERE VEGETALE UTILISEE POUR CETTE ETUDE

Elle a trois origines différentes :

- Chou rouge (variété "Tête de Nègre") récolté à maturité en novembre 1963.
- Plantules de choux cultivées en atmosphère contrôlée, sur papier filtre imprégné de liquide nutritif (milieu de KNOPP).
- Plantules de seigle "PETKUS" cultivées dans les mêmes conditions que les plantules de choux.

Culture des plantules

10 g de graines de chou sont uniformément réparties dans des bacs en tôle galvanisée (45x62x7 cm) garnis de 3 épaisseurs de papier filtre imprégné de liqueur de KNOPP enrichie d'une solution d'oligo-éléments de HELLER (1).

Dans les mêmes conditions, on répartit 100 g de graines de seigle à la surface d'une couche de vermiculite de 4 cm d'épaisseur imprégnée de 2 litres de la solution nutritive précédente. L'utilisation d'un milieu poreux tel que la vermiculite facilite le développement rapide des racelles qui atteignent après quelques jours de croissance 8 à 10 cm de hauteur.

La germination et le développement des plantules ont lieu à l'obscurité jusqu'au 8ème jour; la température est maintenue à 20°C et le taux d'humidité de l'atmosphère à 30% H, dans un local spécialement aménagé pour cet usage.

Après 8 jours de croissance à l'obscurité, les plantules sont exposées à la lumière de 4 tubes fluorescents Philips, de 40 Watts chacun, type lumière du jour, à une distance moyenne de 45 cm, pendant 4 jours.

L'éclairement est périodique avec un cycle de 4 minutes d'obscurité pour 2 minutes de lumière. Une minuterie avec un système de cames et un moteur synchrone permet de réaliser éventuellement d'autres cycles d'éclairement.

La lumière interrompue et périodique facilite l'anthocyanogénèse, comme l'ont signalé DOWNS et SIEGELMANS (2), pour les plantules de sorgho.

Les plantules de seigle ont, à ce stade, de 8 à 9 cm de hauteur, tandis que les plantules de choux atteignent 4 cm (depuis la naissance des racines jusqu'au sommet des plantules). Plantules de chou et de seigle sont fortement colorées en rouge et en rose, ce qui indique une richesse notable en pigments anthocyaniques. Dans ces conditions, on récolte par bac environ 100 g de plantules de seigle et 90 g de plantules de chou.

CHAPITRE II

EXTRACTION DES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES

A. Traitement du chou à maturité

Méthode par précipitation à l'acétate de plomb

Le procédé utilisé s'inspire des méthodes employées par CHMIELEWSKA (3) et FREY-WYSSLING (4) pour l'extraction des pigments anthocyaniques du chou et de celle que nous avons proposée nous-même pour l'extraction des pigments anthocyaniques d'une orge colorée (5_b).

1,5 kg de feuilles, dont on a enlevé les nervures principales, sont découpées en petits morceaux puis broyées à l'homogénéiseur avec 5 litres de C_2H_5OH à 2% ClH (v:v). La solution alcoolique obtenue est très rouge. Elle est ensuite filtrée sur coton hydrophile, puis précipitée avec 1 litre d'acétate de plomb à 20%, le pH étant amené à 7. On sépare par centrifugation 1,6 kg de précipité humide bleu.

Le mélange de sels de plomb est ensuite dispersé dans 2,200 l d'éther de pétrole. On maintient l'agitation pendant 30 mn., puis on centrifuge; la solution surnageante colorée en jaune est éliminée. L'opération est répétée deux fois, puis on sèche le précipité par évaporation sous vide, ce qui élimine l'éther de pétrole et une partie de l'eau. Le précipité, partiellement desséché, est dispersé dans 1 litre d'acide acétique pur par agitation. L'attaque est lente et nécessite le renouvellement de l'acide; nous en avons utilisé en tout 5 litres. La solution très colorée est centrifugée pour en éliminer les sels de plomb non solubles, soit 150 g.

La solution acétique concentrée à 1 litre par évaporation dans un appareil cyclone à une température de 25-30°C est à son tour précipitée avec 2,5 l d'éther éthylique sec et soigneusement purifié. Pour faciliter la récupération du sel de plomb, on centrifuge, élimine l'éther éthylique surnageant et, après lavages répétés avec ce solvant, le précipité obtenu -couleur lie de vin- est finalement séché par évaporation sous vide. Ce résidu (130 g) lavé avec 1,200 l d'acétate d'isopropyle est ensuite décomposé avec 3,700 l de mélange propanol-méthanol-acide chlorhydrique conc. (1000:100:25) (v:v) (6). La solution alcoolique est concentrée par évaporation et amenée finalement à 600 ml; cet extrait enrichi en pigments est directement utilisable pour le fractionnement chromatographique.

B. Traitement des plantules de chou et de seigle

Nous avons appliqué les mêmes procédés d'extraction des pigments anthocyaniques aux plantules de chou et de seigle.

a) Extraction des pigments avec le mélange acétone-eau

200 g de plantules, dont la teneur moyenne en eau est de 90%, sont gelées à - 78°C et broyées à l'homogénéiseur avec 2 litres de mélange acétone-eau (80:20) v:v préalablement refroidi à - 20°C. On filtre sur buchner et ajoute à la solution limpide et jaune un volume égal d'éther éthylique sec (7). Le mélange se sépare en 2 phases : la partie supérieure étherée est enrichie en chlorophylles et caroténoïdes, tandis que la partie inférieure aqueuse contient la totalité des pigments anthocyaniques. La couche inférieure, faiblement colorée en rose, est ensuite gelée puis lyophilisée. L'extrait sec est traité avec 30 ml de mélange : propanol-méthanol-acide chlorhydrique (1000 : 100 : 25) v:v; la solution d'un rouge vif est ensuite soumise directement au fractionnement chromatographique.

b) Extraction au méthanol

Un autre processus d'extraction employé quelquefois consiste à traiter les plantules avec 2 litres de méthanol à la place du mélange acétone-eau.

Après dessiccation de l'extrait par évaporation à une température inférieure à 25-30°C, on le purifie par lavages répétés à l'éther de pétrole ou au chloroforme, ce qui a pour effet d'en éliminer chlorophylles, caroténoïdes et lipides. Le résidu est ensuite dissous dans le mélange propanol-méthanol-ClH pour le fractionner.

Les extraits et les solutions alcooliques acides de pigments anthocyaniques sont conservés au réfrigérateur à -5°C dans l'attente de leur utilisation. La conservation à la température ambiante entraîne à la fois des polymérisations et l'hydrolyse partielle des pigments les plus fragiles.

CHAPITRE III

TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUES

Les méthodes chromatographiques se sont révélées des méthodes de choix pour l'analyse des substances naturelles dont la fragilité va de pair avec leur complexité. Les méthodes classiques de la chimie organique, bien qu'adaptées à l'heure actuelle à l'étude de quantités de substances de l'ordre du milligramme, ne permettent pas, en raison de leur caractère destructif, d'étudier sans difficultés des pigments fragiles tels que les anthocyanes. Ceux-ci se détruisent facilement et ne peuvent être transformés en dérivés caractéristiques. Notamment l'acétylation des sels de 3 et 5 flavylium conduit aux acétates de la pseudo-base tandis que d'autres sels de flavylium sont transformés dans les mêmes conditions en acétates de chalcones (8).

L'introduction de la chromatographie de partage sur papier par BATE-SMITH (9), (10), marque un tournant décisif dans les méthodes de fractionnement et l'isolement des pigments anthocyaniques naturels. Les techniques de chromatographie ont atteint depuis une telle perfection qu'elles peuvent être considérées, à juste titre, comme une véritable méthode dont les possibilités vont de la simple comparaison analytique de deux substances à l'isolement et à la purification d'isomères difficiles à séparer.

La chromatographie permet également d'établir des relations entre Rf et nombre de substituants de même nature fixés sur une structure fondamentale donnée; cet aspect moins connu des possibilités de la méthode a été développé par BATE-SMITH (11).

L'amélioration des appareils d'analyse photodensitométrique peut encore faire de la chromatographie traditionnelle une méthode d'analyse quantitative rapide et simple des mélanges complexes de substances naturelles, complétant ainsi les acquisitions récentes de la chromatographie en phase gazeuse utilisée pour les substances volatiles.

A. Chromatographie analytique

a) Chromatographie sur papier.

Au cours de ce travail, nous avons le plus souvent utilisé la chromatographie sur papier (Whatman I et Arches 302) monodimensionnelle et bidimensionnelle, ascendante et descendante. Les solvants de développement suivant la nature des substances à séparer ou à identifier (pigments anthocyaniques, sucres, acides phénols) seront indiqués pour chaque cas particulier. Certains ont été déjà proposés dans la littérature; d'autres, mis au point au laboratoire, se sont avérés excellents pour la séparation des pigments anthocyaniques et des acides phénols.

Il est superflu de décrire la méthode; cependant, nous croyons nécessaire de rappeler quelques règles très simples auxquelles nous nous sommes conformé :

- utilisation des solvants après équilibre préalable de 12 à 24 heures.
- température de développement $24^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C.}$
- essais de séparation avec plusieurs solvants de nature différente pour s'assurer de l'unicité de la tache correspondant à un constituant supposé seul.

b) Chromatographie sur couches minces

1° Préparation des chromatoplaques

Les chromatoplaques analytiques sont préparées par pulvérisation de suspensions aqueuses :

- de cellulose (Camag, et M N 300 Macherey Nagel)
- de polyamide (Woelm)
- de silice (Kieselgel G et H Merck)

selon le procédé que nous avons décrit précédemment (12). Ce procédé a l'avantage de permettre l'utilisation de lames de verre d'épaisseur et de dimensions quelconques. La suspension est pulvérisée au moyen d'un pistolet à peinture de modèle courant, procédé qui rend beaucoup plus simple et surtout plus rapide la préparation des plaques analytiques.

Nous rappellerons les conditions de préparation des couches de polyamides, avec liant; leur utilisation conduit à des résultats sensiblement différents de ceux mentionnés dans la littérature (les couches sont préparées sans liant et, de ce fait, sont plus fragiles).

BHANDARI et coll. (13) préparent les couches de polyamide Woelm par étalement d'une suspension de 1g de polyamide dans 13,5 ml d'éthanol par plaque de 20 x 20 cm. Les couches, très fragiles, sont difficiles à manipuler; c'est pourquoi nous préférons ajouter à la suspension de l'empois d'amidon de riz qui fixe la couche après séchage et lui donne une grande ténacité.

Le procédé a été décrit dans un travail antérieur (12). Les couches obtenues sont homogènes et leur uniformité a pu être appréciée par enregistrement photodensitométrique (12). Dans le tableau I, nous avons rassemblé les caractéristiques de couches différentes obtenues par notre procédé.

	Cellulose	Polyamide	Kieselgel G
Poids moyen (en mg/cm ²)	2,3	2,6	7,1
Epaisseur moyenne (en mm)	0,15	0,15	0,20

TABLEAU I

De plus, cette technique simple permet de préparer des couches très minces de l'ordre de 0,15mm d'épaisseur qui facilitent certaines séparations.

2° Utilisation des chromatoplaques

Les chromatoplaques sont introduites après grattage d'une zone latérale de 0,5cm (pour éviter les effets de bord) dans une cuve de verre ou de polyéthylène (22 x 21 x 10cm) dont le fond contient le solvant de développement.

La saturation est obtenue par revêtement de deux parois intérieures de la cuve avec des feuilles de papier filtre imprégnées de solvant. La chromatographie

est développée par voie ascendante par simple ou double développement et, plus rarement, par débordement selon la technique de BRENNER et NIEDERWIESER (14). Pour certaines séparations délicates, nous avons expérimenté des chromatoplaques de grandes dimensions (20 x 45 cm) qui permettent des migrations plus étendues (séparation des acides hydroxycinnamiques). Les mélanges à séparer sont déposés sur les plaques à 2 cm du bord inférieur soit à l'aide d'un capillaire obtenu par étirement d'une pointe de verre au chalumeau, soit à l'aide d'une microseringue Hamilton de 10 ou 50 μ l. Suivant l'importance du volume de solution à séparer, les dépôts sont faits sous forme de taches de 2 à 3 mm de diamètre, ou sous forme de traînées de même épaisseur. Dans tous les cas, il est indispensable de ne pas rayer trop profondément la couche support pour éviter de perturber la séparation des constituants au cours du développement. Dans la plupart de leurs applications, les différentes couches minces ont été utilisées en chromatographie de partage. Cependant, pour certaines séparations, nous avons utilisé des couches de silice en chromatographie d'adsorption après dessiccation préalable pendant 30 mn à l'étuve à 100° C.

B. Chromatographie préparative

a) Chromatographie sur colonne.

Bien que cette technique chromatographique ne nous ait pas donné satisfaction en général, nous avons utilisé des colonnes de cellulose et de polyamide pour fractionner les pigments anthocyaniques et certains dérivés flavoniques (kaempferol 3 sophoroside). Des séparations satisfaisantes d'esters de l'acide sinapique et de pigments anthocyaniques ont été obtenues sur colonnes (20 x 2 cm) de gel de dextrane (SEPHADEX G 25) à l'aide d'un tampon phosphate.

Le fractionnement et l'entraînement des zones sont obtenus par élution des colonnes du haut vers le bas; des éluats de volumes égaux (10 à 25 ml) sont recueillis à l'aide d'un séparateur de fractions.

b) Chromatographie sur papier épais.

Le fractionnement, l'isolement et la purification des pigments anthocyaniques ont été effectués par chromatographie sur feuille de papier épais Whatman 3 MM et Arches 304 selon la technique déjà utilisée par HARBORNE (15) et RIBEREAU-GAYON (16). On dépose, sous forme de traînées de 40 cm de long, 2 à 2,5 ml de solution à fractionner par feuille (46,5 x 57 cm).

L'isolement de quantités pondérables d'un pigment donné de l'ordre de quelques milligrammes exige de ce fait une centaine de chromatogrammes. C'est pourquoi le fractionnement a lieu dans des cuves de grandes dimensions en verre et bois baké-lisé où l'on peut loger simultanément 20 feuilles de papier. Pour un nombre limité de

46

←

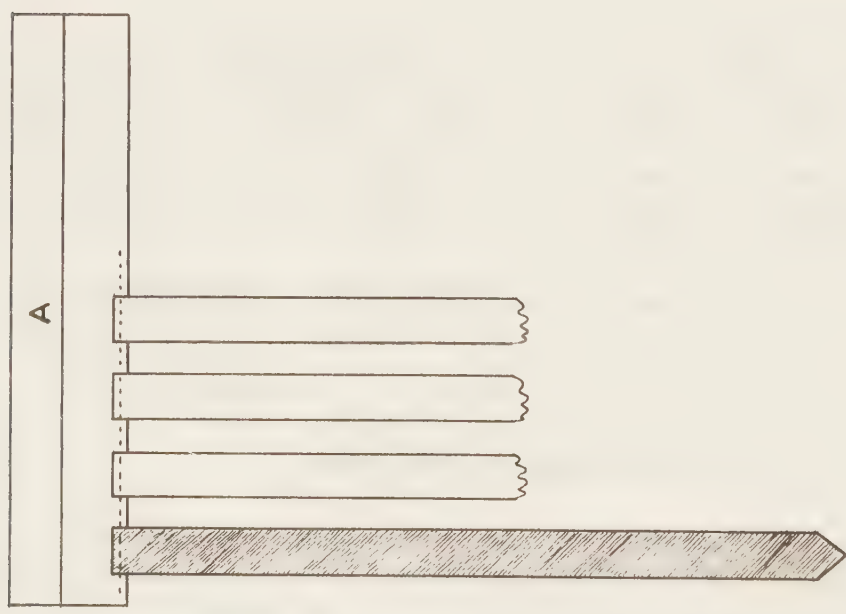


Fig. 1a

↑ 4 × 5 ↓



Fig. 1b

chromatogrammes, il est préférable d'utiliser des cuves en verre épais pour chromatographie bidimensionnelle (57 x 55 x 21 cm) qui peuvent recevoir jusqu'à 5 feuilles de papier (46,5 x 57 cm).

Les solvants de développement sont les mêmes que ceux que nous avons employés en chromatographie sur papier analytique. Les zones localisant les substances séparées sont ensuite découpées au ciseau puis fragmentées en petits morceaux d'environ 2 x 1 cm. Ces derniers sont immergés dans un mélange d'élution, généralement Méthanol-ClH 3 %, puis le papier est réduit à l'état de pulpe par broyage à l'homogénéiseur selon la technique déjà décrite (5_a). Par filtration sous vide, il est commode de récupérer la solution alcoolique enrichie en pigment.

La méthode précédente est rapide, mais elle ne permet pas de récupérer dans sa totalité les substances fixées sur le papier et, en particulier, les pigments anthocyaniques. C'est pourquoi nous lui avons substitué une méthode d'élution analogue à l'élution en chromatographie descendante. RIBEREAU-GAYON, dans son travail sur les pigments anthocyaniques du raisin (16), décrit une technique semblable.

Pour faciliter l'élution simultanée de plusieurs bandelettes de papier imprégnées de pigment, on les fixe par piqûres à la machine à coudre sur un morceau de papier de 46 x 9 cm (Fig. 1 a). On découpe ensuite au ciseau la partie intermédiaire comprise entre les bandes pour obtenir un ensemble homogène de bandelettes solidaires de la partie commune transversale A (Fig. 1 b). La partie A est mise à tremper dans le solvant d'élution contenu dans un récipient à section triangulaire en polyéthylène (Fig. 1 c).

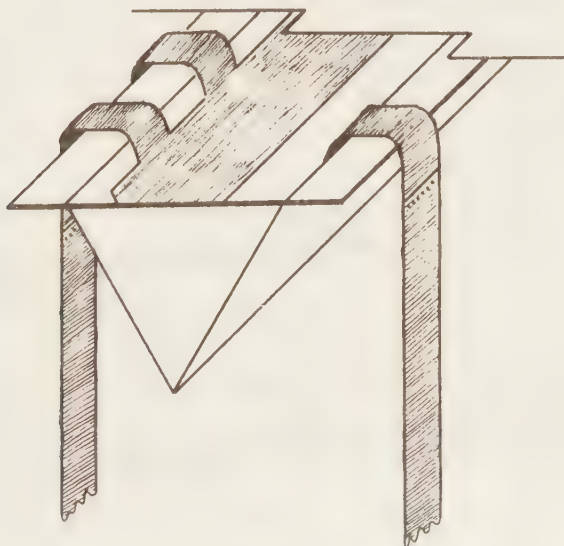


Fig. 1c

L'élution est conduite avec le solvant :

H⁺ COOH aqueux 1,5% - C₂H₅OH (1:2) v/v et dure généralement de 20 à 30 heures pour être complète. Pour obtenir des éluats concentrés en pigment, il faut prendre soin d'arrêter l'élution aussitôt après la fin de la migration.

Nous croyons utile de faire remarquer que le fil à coudre contenant parfois des produits blancophores susceptibles de se dissoudre dans les éluats, il est prudent, avant de s'en servir, de vérifier son comportement vis-à-vis du solvant utilisé.

c) Chromatographie sur couches épaisses

La séparation sur chromatoplaques analytiques de quantités de substances de l'ordre du milligramme pour une traînée de 10 à 15 cm rend fastidieux l'isolement de quantités supérieures à 1 centigramme. La préparation de couches de l'ordre de 0,7-0,8 mm d'épaisseur facilite beaucoup ce travail d'isolement; dans ces conditions, on peut fractionner par plaque jusqu'à 3 mg de produits secs.

Après examen de techniques diverses de préparation des couches par étallement (17) (18), nous avons retenu la méthode proposée par LEES et DE MURIA (19) dont nous nous sommes inspiré. Elle consiste à étaler à l'aide d'une tige de verre la suspension de cellulose entre 2 épaisseurs de ruban adhésif, disposées latéralement de part et d'autre de la chromatoplaque.

En ce qui nous concerne, nous avons substitué aux morceaux de ruban adhésif deux anneaux de caoutchouc d'épaisseur homogène. Ces anneaux sont simplement tendus des deux côtés de la plaque de verre, ce qui permet d'étaler aisément la suspension de cellulose ou de silice dans la partie intermédiaire. Les couches obtenues ont de 0,6 à 0,8 mm d'épaisseur. La quantité de cellulose répartie par plaque (20 x 20 cm) est de 7,5 g. (Fig. 2).

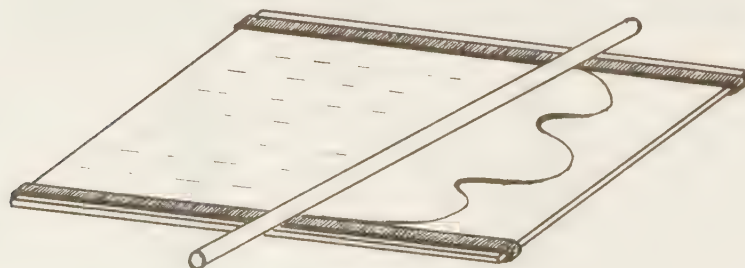


Fig. 2

On dépose ensuite par surcharge sur chaque plaque 0,5 à 1 ml de solution à séparer sous forme d'une traînée de 10 à 15 cm à l'aide d'une pipette de verre de 2 ml à bout effilé. Les chromatoplaques sont ensuite disposées sur un support en verre en forme d'épi dans une cuve qui peut en contenir 18 (20).

Le développement a lieu par voie ascendante et l'isolement des zones intéressantes est effectué par grattage à la spatule; la poudre obtenue contenant la substance à extraire est entraînée dans un entonnoir en verre fritté où l'élution est poursuivie par lavages successifs avec le solvant approprié. L'isolement des pigments anthocyaniques sur couches de cellulose est obtenu avec le solvant d'élution :



L'éluat recueilli contient généralement une petite quantité d'hémicelluloses qu'il est indispensable d'éliminer, notamment pour les mesures spectrales; on s'en débarrasse facilement par centrifugation à 15 000 t/mn pendant 10 minutes.

C. Chromatographie quantitative

a) Chromatographie sur papier et photométrie

L'analyse des éluats par spectrophotométrie U. V. ou Visible ne permet pas de déterminer aisément les concentrations d'un mélange de 2 constituants dont les structures chimiques sont voisines; c'est le cas, par exemple, d'isomères géométriques d'acides phénols de la série cinnamique. Il est nécessaire, au préalable, de séparer les constituants par chromatographie; ces opérations sont longues et exigent la mise en œuvre de quantités d'au moins 60 à 100 µg de substances. La photométrie directe sur papier associée à une séparation chromatographique offre l'avantage de limiter les opérations d'isolement et peut être appliquée facilement à des quantités de l'ordre d'une dizaine de microgrammes seulement. Nous avons utilisé cette technique pour la détermination d'acides phénols (21). Son fondement repose sur l'application de la loi de BEER aux milieux translucides et isotropes. Les possibilités de la photométrie sur papier ont fait récemment (22) l'objet d'une étude critique qui fait surtout ressortir les imperfections des enregistreurs d'extinction actuels; moyennant quelques améliorations, la méthode est appelée à un développement certain.

b) Chromatographie sur couches minces et photométrie

Dans un article très documenté, KLAUS (23) fait la critique des méthodes photométriques applicables à l'analyse de taches colorées par chromatographie sur couches minces. En particulier, l'influence de la déformation des taches a retenu son attention; il montre que les conditions favorables à une détermination satisfaisante sont les suivantes :

- surface étendue des taches.
- Transmission T élevée.
- Déformation minime des taches par rapport à la tache témoin.
- Dépôt sur la couche mince d'échantillons analytiques à volumes constants.

Nous avons étudié les conditions d'application de la technique à la détermination quantitative d'acides phénols. En voici l'essentiel :

Sur une même plaque $20 \times 20 \times 0,13$ cm, on dépose des volumes égaux de solutions de référence et d'échantillons à doser. La solution à analyser, cette même liqueur diluée deux fois, sont intercalées entre trois solutions de référence de concentrations relatives $1 - 1/2 - 1/4$. La disposition des taches après migration est indiquée par la figure 3. On révèle le chromatogramme puis on découpe au diamant une lame de 2 à 4 cm de largeur, perpendiculairement au sens du développement.

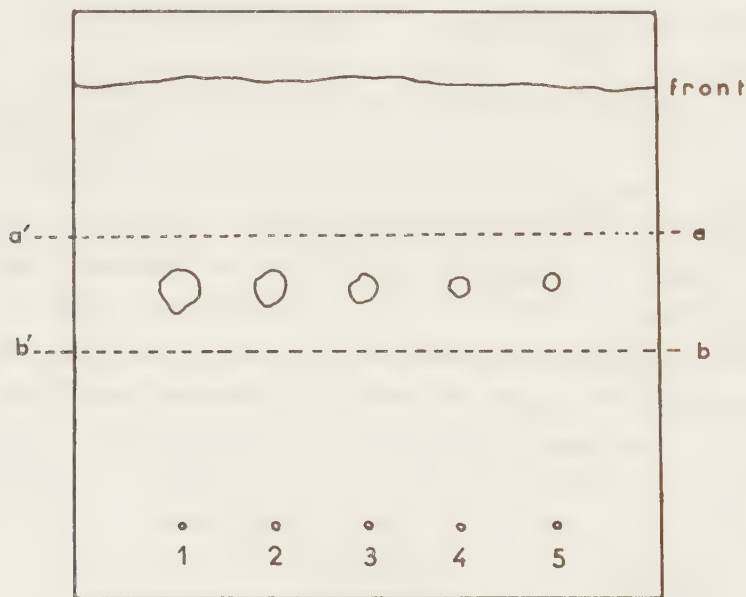


Fig. 3

La chromatoplaque, après révélation des taches, est découpée au diamant suivant a a', b b'. La lame de verre a b b' a' est ensuite examinée au photodensitomètre.

a b = a' b' = 2 à 4 cm

1, 3, 5 : taches correspondant aux témoins

2, 4 : taches correspondant à l'échantillon et à l'échantillon dilué.

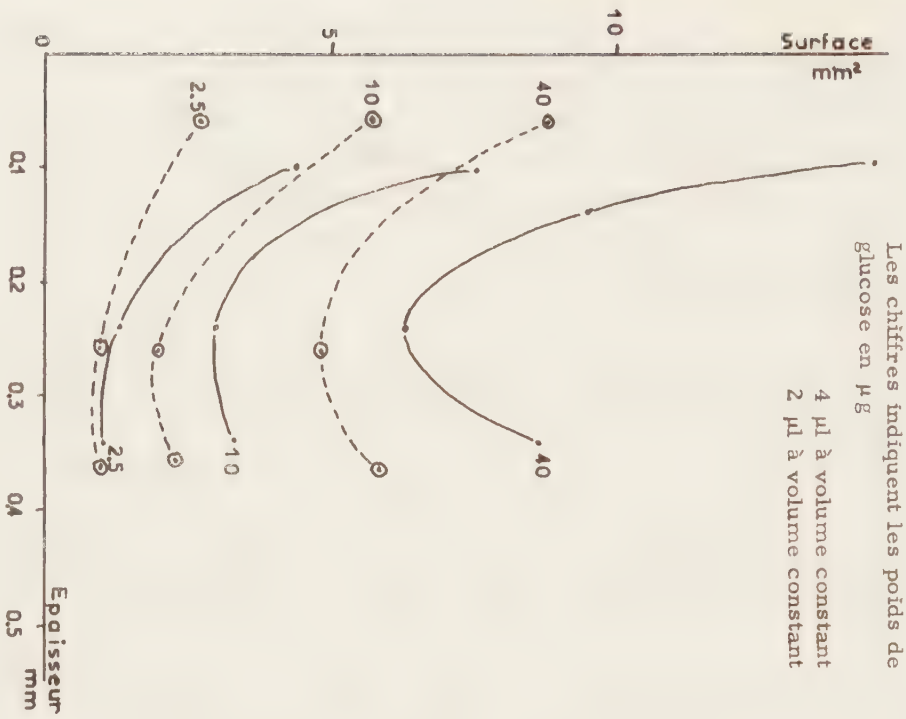
Chaque lame porte les taches d'un même constituant plus ou moins centré, donc formant échelle de teintes après révélation (Fig. 3). On trace au photomètre enregistreur la courbe d'extinction de chaque tache par balayage avec une fente, de longueur et largeur réglables, éclairée en lumière orange 700 mμ pour les sucres révélés au nitrate d'argent ainsi que pour les acides phénols révélés au réactif de BARTON (24). L'aire de la courbe d'extinction est proportionnelle à la quantité de substance contenue dans la tache.

Les droites obtenues conduisent à deux déterminations, l'une sur la solution inconnue, l'autre sur la solution diluée; la moyenne des deux déterminations donne la concentration.

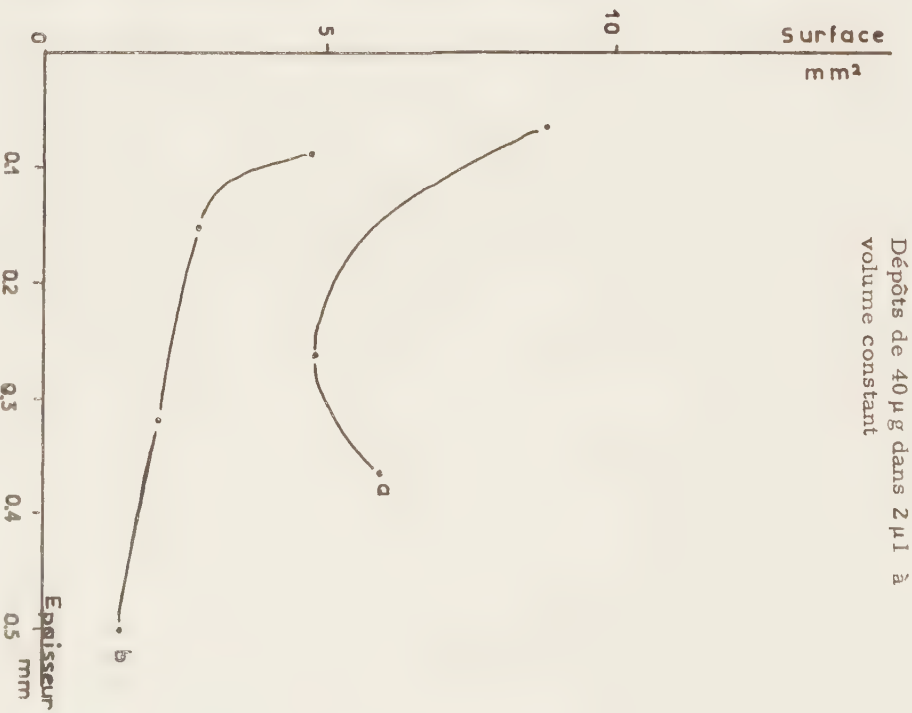
La précision des mesures est de l'ordre de 3 à 10% pour les sucres comme pour les acides phénols. Cependant, la bonne application de la méthode dépend surtout de l'homogénéité et de l'épaisseur de la couche support.

Pour préciser les conditions optima de préparation des couches minces que nous employons en chromatographie quantitative, nous avons procédé à une étude systématique de l'influence de ces facteurs sur la séparation, la grandeur et la netteté des taches. Avec le solvant de PREY (25), butanol-acide acétique-eau (5 : 4 : 1) v/v, le Kieselgel G. de Merck recevant les dépôts à volumes constants (respectivement 40-10-2, 5 μg de glucose) en solution dans 4 et 2 μl donne lieu à des taches dont la surface dépend de l'épaisseur des couches. La surface décroît, passe par un minimum, puis croît à nouveau en fonction de l'épaisseur de la couche (Fig. 4_a). Pour des solutions de glucose (40-30-20-10-5-2, 5-1, 25 μg respectivement dissous dans 2 μl et dans 4 μl d'eau), l'accroissement de la surface des taches est relativement plus grand pour les dépôts plus copieux, le minimum étant atteint pour une épaisseur de support de 0,20 à 0,30 mm. Nous avons donc été amené à retenir une épaisseur de la couche de Kieselgel de 0,25 mm pour des dépôts de 2 μl (Fig. 4_a). Remarquons d'ailleurs que STAHL et coll. (26) ont montré une dépendance étroite du R_f et de l'épaisseur de la couche, considérant l'épaisseur 0,20-0,30 mm comme la mieux adaptée.

Pour la cellulose, avec le solvant de SCHWEIGER (27), acétate d'éthyle-pyridine-eau (2 : 1 : 2) v/v, le phénomène apparaît du même ordre. La courbe aire des taches/concentration présente une partie rectiligne; dans cette région, la surface des taches varie peu pour des épaisseurs comprises entre 0,10 et 0,30 mm. Nous avons retenu pour cette raison des épaisseurs de l'ordre de 0,15 à 0,20 mm qui permettent de concilier la partie rectiligne de la courbe avec une transparence satisfaisante de la couche (Fig. 4_b). De plus, à granulométrie équivalente, les couches de cellulose obtenues par pulvérisation sont plus homogènes que les couches obtenues par étalement. Par contre, les couches de Kieselgel sont comparables, qu'elles résultent de l'emploi de l'une ou de l'autre technique.



4a Variation de l'aire des taches de glucose avec l'épaisseur des couches de Kieselgel G.



4b Variation de l'aire des taches de glucose avec l'épaisseur des couches de cellulose.

Avec les couches de polyamide, il se produit des retraits locaux au cours du séchage avec formation de craquelures d'autant plus marquées que la couche est plus épaisse. Malgré cet inconvénient qui en limite l'utilisation, nous avons pu employer dans quelques applications des couches de 0,10 à 0,12 mm d'épaisseur (Fig. 5).

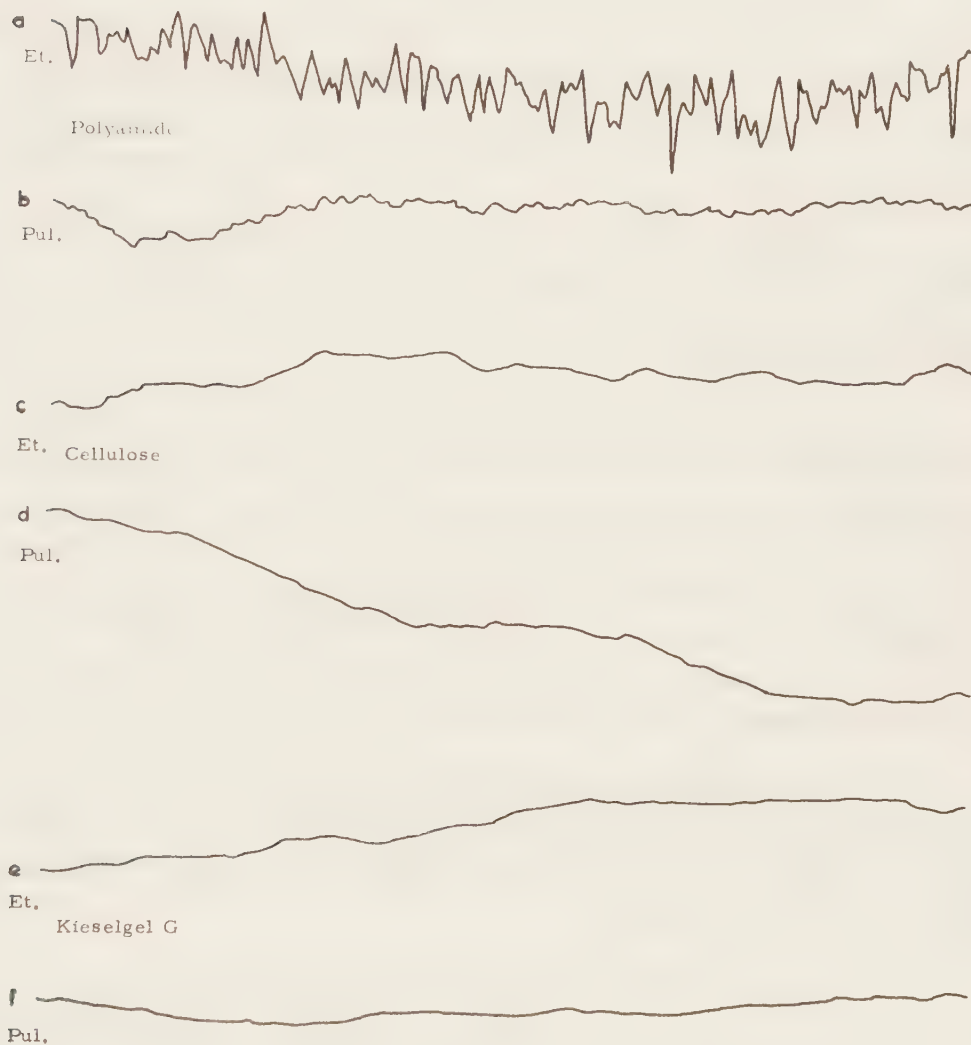


Fig. 5

Enregistrement photométrique de l'homogénéité des couches minces préparées par étalement et par pulvérisation

CHAPITRE IV

TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT PAR ELECTROPHORESE

Cette technique, développée surtout dans la chimie des protéines, peut être cependant utilisée chaque fois qu'il s'agit de séparer des substances susceptibles de s'ioniser et de libérer des particules chargées dans un milieu conducteur du courant électrique. Outre son utilisation dans le fractionnement des protéines, l'électrophorèse a été notamment employée pour séparer de petites molécules telles que les amino-acides.

Nous avons employé cette technique pour la séparation et l'identification d'acides phénols, ainsi que pour la séparation des pigments anthocyaniques.

A. Electrophorèse sur papier

L'appareillage utilisé comporte un générateur de courant continu de 1Kw. susceptible de délivrer une tension élevée (2000 V.) et une platine horizontale en aluminium (50 x 40 cm) réfrigérée par circulation d'un mélange eau-glycol maintenu à + 3° C. La surface de la platine est revêtue d'une feuille de polystyrène qui l'isole de la feuille de papier sur laquelle est effectuée la séparation électrophorétique. L'ensemble du dispositif formé par la platine et les bacs à tampon est enfermé dans une enceinte de plexiglass pour éviter à la fois l'évaporation du tampon et une condensation due à l'humidité atmosphérique sur l'appareil en cours de fonctionnement.

Les séparations monodimensionnelles sont effectuées sur feuilles de papier Whatman 3 MM et Whatman n° 4 (56 x 18 cm) et sur feuilles (56 x 45 cm) pour les fractionnements bidimensionnels où l'on associe l'électrophorèse (1ère dimension) à la chromatographie (2ème dimension).

Le papier Whatman n° 4 conduit généralement à des séparations plus nettes que le Whatman n° 3 MM; les zones sont moins diffuses et le flux d'électroendosmose plus réduit. Pour la séparation des acides phénols nous avons retenu le tampon : pyridine-acide acétique pH 5,3 d'après EFRON (28)

Pyridine	25 ml
Acide acétique	10 ml
Eau q. s.	2.500 ml

Les conditions électriques les plus favorables sont les suivantes :

Tension	1.500 V
Intensité	30 mA
Durée	3 heures
Température	3 - 4° C

Cette technique est voisine de celle proposée par STURM et SCHEJA (29) pour la séparation des acides phénols de l'urine humaine.

50 à 100 μ l de mélange à fractionner sont appliqués sous forme de tache ou de traînée en un point de la feuille de papier situé environ à 10 cm du compartiment cathodique, les acides phénols migrant vers l'anode. La feuille de papier est ensuite trempée dans le tampon, une extrémité après l'autre, en prenant bien soin de ne pas mouiller la partie intermédiaire où se trouve déposé l'échantillon. L'excès de solvant est ensuite éliminé par expression à l'aide d'un rouleau de caoutchouc passé sur la feuille. L'humidification est encore suffisante pour permettre au tampon de gagner par capillarité la région où a été déposé l'échantillon. De plus, pour limiter la migration capillaire du tampon vers le centre de la feuille, au cours de la séparation, on la surcharge avec une lame de verre de 2,5 cm d'épaisseur qui la recouvre en entier. Une humidification excessive de la feuille de papier provoquerait la diffusion des zones de séparation et un accroissement notable de l'intensité du courant, ce qui se traduit par une dissipation anormale de chaleur.

B. Electrophorèse sur couches minces

Les progrès rapides de la chromatographie sur couches minces ont entraîné le développement parallèle des techniques d'électrophorèse sur supports de silice et de cellulose. Les travaux d' HONEGGER (30) sur la séparation des amines et des amino-acides puis de PASTUSKA et TRINKS (31) (32) sur la séparation des phénols et des acides phénols ont facilité l'application de cette technique à la séparation de diverses substances telles que certaines matières colorantes alimentaires (33).

Nous avons appliqué cette technique en association avec la chromatographie pour séparer et identifier les acides phénols. Les conditions les plus favorables variables pour l'ensemble des supports, cellulose, polyamide et Kieselgel G, sont brièvement résumées ci-dessous :

Composition des tampons utilisés :

Tampon pH 5,3 d'après EFRON (28)		Tampon pH 3,6 d'après EFRON	
Pyridine	25 ml	Pyridine	10 ml
Acide acétique	10 ml	Acide acétique	60 ml
Eau q. s.	2.500 ml	Eau	900 ml

TABLEAU II

Pour la séparation des pigments anthocyaniques sur couches minces de cellulose, nous nous sommes référé au travail de MARKAKIS (35) sur la séparation de la méocyanine et de l'antirrhine sur papier avec de l'acide orthophosphorique 0,03 M comme tampon. Nous avons choisi comme électrolyte HCOOH 0,1 N saturé de n-butanol pH = 2,3. Dans ces conditions, les pigments migrent vers la cathode. On fixe le gradient de potentiel à 75 V/cm et la durée de migration est limitée à 2h30, conditions requises pour une bonne séparation.

On se sert des chromatoplaques comme d'une feuille de papier. La couche mince de cellulose 20 x 20 cm est disposée au centre de la platine refroidie; la conduction du courant électrique est assurée au moyen de deux ponts de papier Whatman I dont les extrêmités plongent respectivement dans l'électrolyte des compartiments anodique et cathodique.

Le support est imprégné d'électrolyte selon la technique de GRIDDLE (33) par migration capillaire de la solution tampon à travers les ponts de papier en veillant à ce que les deux courants de sens opposés se rencontrent au niveau de la tache ou de la traînée déposée. Les dépôts sont de 5 à 10 µl en solution dans le méthanol. Nous avons exprimé les résultats des migrations en mobilités apparentes relatives : par rapport au cyanidol 3 glucoside pour les pigments anthocyaniques et par rapport à l'acide p.hydroxy phényl propionique pour les acides phénols. L'expression des résultats en mobilités absolues ne peut être retenue à cause des nombreuses causes d'erreur qui entachent cette détermination.

CHAPITRE V

TECHNIQUES RADIOCHIMIQUES

A. Préparation des plantules

Les plantules étiolées de seigle et de chou sont sectionnées à niveau de leurs racines et introduites immédiatement dans un bécher de 15 ml contenant 1,8 ml d'une solution nutritive de Moyse (36). On ajoute à cette solution, comme seul élément organique, le précurseur radioactif que l'on veut incorporer.

Composition de la solution nutritive de Moyse :

NO_3K	10 g
$(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$	1 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	2 g
SO_4Mg	1 g
Cl_3Fe	traces
H_2O	1000 g

Les plantules dépourvues de leurs radicules sont exposées ensuite à l'action de la lumière fluorescente dans les mêmes conditions que pour les plantules complètes.

B. Autoradiographie

Nous nous sommes inspiré de la technique de JOLCHINE (37).

Les chromatogrammes sur papier ou sur couches minces sont pulvérisés à deux reprises avec une solution de toluène contenant :

- 4 g de 2,5 diphényl oxazole puriss. (PPO)
- 0,1 g de 1,4 Bis (2 - (5-phényl oxazolyl) benzène puriss. (POPOP)

Après évaporation du solvant, le chromatogramme (papier ou chromatoplaque) est appliqué contre un film KODAK Régulix HS type 2. Le temps de pose est de 8 jours à 3 semaines après lequel le film est révélé de la manière habituelle.

C. Mesure de la radioactivité

Les mesures de radioactivité sont effectuées à l'aide d'un compteur Geiger-Muller à circulation de gaz et à fenêtre de "mylar" de $0,9 \text{ mg/cm}^2$.

Les produits actifs séparés par chromatographie sont élués par les méthodes habituelles et transférées sur des coupelles en polyéthylène de 3 cm de diamètre en prenant soin de dessécher complètement les préparations.

La radioactivité est exprimée en nombre de coups par minute en tenant compte du mouvement propre.

Nous avons utilisé aussi un enregistreur de radiochromatogrammes (Actigraph II Nuclear Chicago) pour la localisation des taches les plus actives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

lère Partie

- 1 - Gautheret R. J., "La culture des tissus végétaux"
Masson et Cie Editeurs (1959) 11.
- 2 - Downs R. J. et Siegelmanns H. W., Plant. Physiol. (1963) 38, 25.
- 3 - Chmielewska I., Roczn. Chem. (1936) 16, 384.
- 4 - Frey-Wyssling A. et Blanck F., Ber. Schweiz. bot. Ges. (1943) 53A, 550.
- 5_a - Metche M. et Urion E., Acad. Sci. (1961) 252, 356.
- 5_b - Urion E. et Metche M., Brauwissenschaft (1961) Nr 5/6, 227.
- 6 - Duncan I. J. et Dustman R., J. Am. Chem. Soc. (1936) 58, 1511.
- 7 - Billot J., Physiol. Vég. (1964) 2, 195.
- 8 - Freudenberg K. et Weinges K., Liebigs Ann. (1958) 613, 61.
- 9 - Bate-Smith E. C., Biochemical Soc. Symp. (1949) n° 3, 62.
- 10 - Bate-Smith E. C., Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. (1956) 27, 165.
- 11 - Bate-Smith E. C. et Westall R. G., Biochim. Biophys. Acta (1950) 427
- 12 - Metche M., Halluk J. P., Nguyen Q. H. et Urion E., Bull. Soc. Chim. (1963), 1080.
- 13 - Bhandari P. R., Lerch B. et Wohlleben G.,
Pharm. Ztg. Ver. Apotheker-Ztg, (1962) 107, 1618.
- 14 - Brenner M. et A. Niederwieser, Experientia (Basel) (1961) 17, 237.
- 15 - Harborne J. B., Biochem. J. (1960_a) 74, 262.
- 16 - Ribereau-Gayon P., (1959), "Recherches sur les anthocyanes des Végétaux. Appli-
cation au genre Vitis". Librairie Générale de l'Enseignement. (Paris).
- 17 - Stahl E. (1962), "Dünnschicht Chromatographie"
Ein Laboratorium handbuch-Springer (Berlin).
- 18 - Cerny V., Joska J. et Labler L., Collection Czech. Chem. Commun. (1961), 26, 1658.
- 19 - Lees T. M. et De Muria P. J., J. Chromatog. (1962) 8, 108.
- 20 - Urion E., Metche M. et Halluk J. P., Brauwissenschaft (1963) Nr 6, 211.
- 21 - Metche M., Jacquin F., Nguyen Q. H. et Urion E., Bull. Soc. Chim. (1962), 1763.
- 22 - Bush I. E., Methods of biochemical analysis Vol. XI Ed. D. Glick (1963) p. 149.
- 23 - Klaus R., J. Chromatog. (1964) 16, 311.
- 24 - Barton G. M., Evans R. S. et Gardner J. A. F., Nature (1952) 170, 249.
- 25 - Prey V., Berbalk H. et Kausz M., Mikrochim. Acta (1961) 968.
- 26 - Stahl E., Schroeter G, Kraft G. et Renz R., Pharmazie (1956) 11, 633.
- 27 - Schweiger A., J. Chromatog. (1962) 9, 374.
- 28 - Efron M. dans Chromatographie and Electrophoretic Techniques
Ed. Y. Smith (1960), p. 158.
- 29 - Sturm A. et Scheja W. H., J. Chromatog. (1964) 16, 194.
- 30 - Honegger C. G., Helv. Chim. Acta (1961) 44, 173.

- 31 - Pastuska G. et Trinks H., Chemiker Ztg. (1961) 85, 535.
- 32 - Pastuska G. et Trinks H., Chemiker Ztg. (1962) 86, 135.
- 33 - Criddle W.J., Moody G.J. et Thomas J.D.R., J.Chromatog.(1964) 16, 350.
- 34 - Markakis P., Nature (1960) 187, 1092.
- 35 - Moyse A., La Nature (1955) 3238, 41.
- 36 - Jolchine G., Physiol. Vég. (1964) 2, 341.

DEUXIEME PARTIE

Identification des pigments anthocyaniques des plantules de seigle et de chou

CHAPITRE I Généralités

- A. Fractionnement des pigments anthocyaniques par chromatographie sur colonne.
- B. Chromatographie de partage sur papier.
- C. Chromatographie sur couches minces.
- D. Séparation par électrophorèse.
- E. Problèmes particuliers aux pigments anthocyaniques acylés.

CHAPITRE II Séparation et isolement des pigments du seigle et du chou rouge.

- A. séparation et isolement des pigments du seigle.
 - a) séparation sur colonne de polyamide.
 - b) chromatographie préparative sur papier épais.
 - 1. Purification du Pigment S I
 - 2. Purification du Pigment S II
 - 3. Purification du Pigment S III
 - 4. Comparaison chromatographique de S I, S II, S III dans différents solvants.
- B. séparation et isolement des pigments du chou.
 - a) séparation sur colonne de cellulose.
 - b) séparation sur colonne de polyamide.
 - c) chromatographie préparative sur papier épais.

CHAPITRE III Identification des pigments isolés du seigle et du chou.

- A. Etude structurale des anthocyanosides.
 - a) identification des aglycones.
 - 1. Chromatographie
 - 2. Spectre d'absorption dans le visible.
 - 3. Microdégradation alcaline.
 - b) identification des sucres.
 - 1. Hydrolyse des pigments et purification des solutions aqueuses de sucres.
 - procédé à la di n octylméthylamine
 - procédé par électro dialyse
 - 2. Identification des sucres par chromatographie sur papier et sur couches minces.

c) nature des liaisons osidiques.

1. Dosage de l'aglycone et des sucres

- dosage de l'aglycone
- dosage des sucres

2. Points d'attache des groupements glycosidiques à l'aglycone.

3. Hydrolyse acide contrôlée des pigments.

d) identification des groupements glycosodiques en 3.

1. Oxydation des pigments par l'eau oxygénée
2. Oxydation permanganique
3. Hydrolyse enzymatique

B. Etude structurale des pigments acylés.

a) détermination de la nature des groupements acylés.

b) identification des principaux acides phénols par chromatographie et électrophorèse.

1. Méthodes générales de séparation et d'identification d'acides phénols d'origine naturelle.

- chromatographie
- électrophorèse

2. Séparation et identification des acides p.coumarique, férulique et sinapique.

- 1° Chromatographie sur couches minces de cellulose
- 2° Electrophorèse

c) dosage des acides hydroxycinnamiques

1. Dosage des acides hydroxycinnamiques libres en solution.
2. Dosage direct.
3. Dosage par fluorescence.
4. Position des groupements acylés sur la molécule d'anthocyanoside.

C. Observations et conclusions sur l'étude structurale des pigments anthocyaniques du seigle et du chou rouge.

a) anthocyanosides des plantules de seigle.

b) anthocyanosides du chou.

c) pigments acylés du chou.

CHAPITRE IV Observations sur l'hydrolyse alcaline des groupements esters.

- a) saponification
- b) origine de l'acide X
- c) isolement de l'acide X
- d) nature de l'acide X

CHAPITRE V Spectre Infra-Rouge de pigments isolés du seigle et du chou.

- 1° Spectre I. R. des anthocyanosides.
- 2° Pigments anthocyaniques acylés.

CHAPITRE VI Etude de la séparation des pigments anthocyaniques par électrophorèse.

DEUXIEME PARTIE

IDENTIFICATION DES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES

DU SEIGLE ET DU CHOU

CHAPITRE I

GENERALITES

Robinson et coll., dans la période qui a précédé la deuxième guerre mondiale, ont réalisé d'une façon brillante la synthèse des pigments anthocyaniques et en ont précisé les caractéristiques qui ont permis de les identifier.

Ces travaux, abordés avec les méthodes de la chimie organique, ont eu le mérite de classer ces substances en catégories de pigments dont les fonctions glycosidiques sont rattachées à des groupements phénoliques d'un petit nombre d'aglycones ou génines.

Cependant la complexité et le nombre des pigments rencontrés dans une même plante, quelquefois différents d'un organe à un autre, ne sont pas faits pour faciliter l'isolement et l'identification de ces substances.

KARRER et coll. (1) (2) eurent l'idée les premiers d'appliquer la chromatographie d'adsorption sur sulfate de calcium à la séparation des pigments anthocyaniques du raisin.

Nouvelle venue parmi les méthodes d'analyse immédiate, la chromatographie d'adsorption s'imposait de façon magistrale dans la séparation et l'identification des pigments caroténoïdes à la suite des travaux de KUHN et de LEDERER (3).

Il semble bien que dans la séparation des anthocyanes d'origine naturelle elle n'ait été que d'une aide imparfaite et cela bien à cause du caractère hydrophile de ces substances.

Malgré l'abandon de principe, la technique de séparation sur colonne a été retenue à plusieurs reprises pour la séparation des pigments d'origines diverses.

A. Fractionnement des pigments anthocyaniques par chromatographie sur colonne.

La plupart des travaux de cette nature ont été effectués par chromatographie de partage. LI et WAGENKNECHT (4), après avoir abandonné l'alumine, utilisent la silice avec un solvant biphasique pour séparer deux cyanidol 3 glycosides de la cerise

aigre, confirmant ainsi les possibilités de cette technique que E. C. SPAETH et ROSENBLATT (5) ont appliquée à la séparation microanalytique d'anthocyanosides de synthèse.

FORSYTH et QUESNEL (6) séparent les pigments anthocyaniques des fèves de cacao sur colonne de cellulose avec un solvant pentanol-acide acétique-eau.

ENDO (7) emploie aussi cette technique pour séparer les pigments des fleurs de Viola tricolor tandis que CHANDLER et HARPER (8) l'appliquent avec un succès mitigé à la séparation des pigments du cassis.

Récemment, STROH (9) a séparé la matière colorante du chou rouge connu sous le nom de rubrobrassine sur colonne de cellulose avec l'acide formique 0,25% comme solvant, tandis que GARBER et coll. (10) font état d'une séparation sur colonne de cellulose par voie ascendante.

CHANDLER et SWAIN (11) ont amélioré la technique de séparation sur colonne en substituant la poudre de nylon à la cellulose.

Dans le cas de mélanges complexes, ce qui est la règle générale, lorsqu'il s'agit d'extraits végétaux, les pigments anthocyaniques sont souvent accompagnés de leucoanthocyanes; leur purification, de ce fait, est rendue difficile et entraîne la répétition des opérations de fractionnement : c'est le cas de la séparation sur cellulose. La poudre de nylon, en raison de la forte capacité d'adsorption des polyamides pour les OH phénoliques due à la formation de liaisons hydrogènes, permet de séparer aisément les divers groupes de flavonoïdes.

L'isolement des pigments anthocyaniques des autres flavonoïdes est particulièrement simple car, peu retenus par la poudre de nylon, ils sont rapidement élués avec les solvants habituellement employés en chromatographie sur cellulose et sur papier. Pour obtenir les pigments dans un état de pureté satisfaisant, il y a nécessité cependant de répéter les fractionnements avec d'autres supports, sur cellulose par exemple

D'autres tentatives de fractionnement ont été poursuivies sur hydroxyde de plomb par ROACH (12) et sur "Magnésol" par WENDER et coll. (13) mais ne semblent pas avoir connu de développement important. Cependant l'utilisation récente par BIRKOFER et coll. (14) de l'alumine acide (pH 5) pour la séparation à l'échelle préparative de pigments formant des complexes avec Al^{3+} (glycosides de : cyanidol, delphinidol, pétunidol) est susceptible de renouveler l'intérêt de la chromatographie sur colonne.

B. Chromatographie de partage sur papier

L'introduction par BATE-SMITH (15) (16) de la chromatographie sur papier comme méthode d'analyse immédiate des mélanges de pigments anthocyaniques marque un tournant important pour l'identification de ces substances.

Les travaux de NORDSTRÖM sur les flavonoïdes du dahlia (17) (18), et surtout l'importante contribution de HARBORNE (19) en Angleterre et de HAYASHI et de son école (20) au Japon, ont mis en évidence les possibilités remarquables de la technique. Des relations simples d'ordre structural basées sur le R_f ($R_M = \log. (\frac{1}{R_f} - 1)$) ont apporté à elles seules plus de renseignements (21) (22) sur la nature des substitutions du noyau phényl 2 benzopyrylium que l'ensemble des essais analytiques proposés auparavant par ROBINSON et son école. Un choix judicieux de solvants acides permet d'établir des différences de R_f caractéristiques entre aglycones possédant respectivement 1, 2, 3 OH sur le noyau phényl latéral (noyau B) (pelargonidol, cyanidol, delphinidol). Au plus grand nombre de OH correspond le R_f le plus bas à la fois dans les solvants alcooliques et aqueux. Les glycosides correspondants se comportent de la même manière : le delphinidol 3 glucoside à un R_f inférieur à celui du pelargonidol 3 glucoside.

La méthylation a un effet opposé à celui de l'hydroxylation. La glycosidation accroît la valeur des R_f dans les solvants aqueux; on observe une variation inverse avec les solvants riches en butanol.

L'acylation, à l'opposé de la glycosidation, provoque une diminution des R_f dans les solvants aqueux tandis que les solvants riches en butanol en favorisent l'accroissement; cependant, dans ce cas, il ne semble pas qu'il existe comme pour la glycosidation de relations bien établies entre R_f et structure.

C. Chromatographie sur couches minces.

L'introduction récente de la chromatographie sur couches minces de cellulose, de silice et de polyamides vient compléter les possibilités déjà nombreuses de la chromatographie sur papier.

Ce qui a été énoncé ci-dessus sur la chromatographie sur papier est applicable à la chromatographie sur couches minces. Celle-ci présente l'avantage d'être plus rapide et plus souple car elle permet à la fois des séparations par adsorption et par partition suivant la nature des supports et des solvants utilisés. De plus, l'utilisation courante de chromatoplaques de dimensions standard (20 x 20 cm) n'est pas limitative; nous montrerons l'intérêt présenté par des plaques de grandes dimensions (45 x 20 cm) pour la résolution de mélanges d'acides phénols difficiles à séparer.

STAHL et coll. (23) ont utilisé le Kieselgel G. pour séparer des glycosides de flavones et d'anthocyanes; bien que les séparations de pigments anthocyaniques soient en général peu satisfaisantes dans ces conditions, cette première tentative d'application des couches minces aux anthocyanes ouvre la voie à d'autres essais. Le travail de BIRKOFER et coll. (24) est des plus intéressants à cet égard et marque une étape importante dans l'utilisation de cette nouvelle technique pour l'identification des pigments an-

thocyaniques. Ces auteurs préparent des couches mixtes de polyamide et de polyacrylonitrile tamponnées avec du $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. Le solvant d'élution est un mélange de n-pentanol - n-propanol - acide acétique - eau (3 : 2 : 2 : 1) v/v. Les résultats sont excellents pour la séparation des anthocyanidols mais moins satisfaisants pour les anthocyanosides. Simultanément, HESS et MEYER (25) ont proposé l'utilisation de couches de Kieselgel G, pour séparer les pigments anthocyaniques des fleurs de Pétunia et leurs aglycones avec les solvants n-butanol - acide formique - eau (85 : 5 : 10) et acétate d'éthyle - acide formique - eau (85 : 6 : 9) v/v. PARIS et PARIS (26) trouvent dans la cellulose et la polyamide deux supports de choix pour séparer anthocyanosides et aglycones. Les solvants utilisés par ces auteurs, comme les précédents, sont acides. Certains d'entre eux, Partridge (27), Forestal (28), sont depuis longtemps employés en chromatographie sur papier. Tout récemment, ASEN (29) a fait état de la chromatographie sur couches épaisses mixtes de cellulose et de silice (1 : 2) pour séparer les pigments des bractées d'Euphorbes. Plusieurs solvants acides sont proposés par cet auteur, notamment eau - acide formique - acide chlorhydrique conc. (8 : 1 : 4) v/v et acétone - acide chlorhydrique 0,5 N (1 : 3) v/v.

D. Séparation par électrophorèse.

L'électrophorèse n'a pu trouver en chimie flavonique que des applications limitées pratiquement à la séparation de flavones, de flavonols et de leurs glycosides (30). A pH 8,6, avec un tampon véronal sodé et de préférence en milieu boraté ou sulfité, les flavonofides se comportent comme des acides faibles que l'on peut séparer par électrophorèse sur papier (31).

Les données de la littérature sont plus confuses en ce qui concerne la séparation des pigments anthocyaniques. La séparation par électrophorèse des pigments de la betterave rouge (32) (33) intéresse une catégorie de pigments rouges naturels classés improprement jusqu'à ces dernières années dans le groupe des anthocyanes azotés. La structure de ces pigments élucidée depuis peu montre que leur constitution chimique est étrangère à la structure flavylum des anthocyanes.

Les observations contradictoires de BAYER (34) sur la séparation de complexes anthocyaniques associés à des ions Fe^{+++} ou Al^{+++} n'encouragent pas à recourir à cette technique.

Cependant, MARKAKIS (35) a montré qu'il est possible de séparer en milieu acide les pigments anthocyaniques de la cerise aigre par cette méthode; la technique se prête à des séparations à caractère préparatif.

E. Problèmes particuliers aux pigments anthocyaniques acylés.

Ces pigments complexes longtemps mal connus ont une structure fondamentale anthocyanoside identique à celle de pigments plus simples avec en plus des groupements esters fixés généralement sur les molécules de sucres de la partir glycosidique. Parmi les acides engagés dans les fonctions esters, on rencontre très souvent l'acide p. hydroxybenzoïque et des acides hydroxycinnamiques dont les plus fréquents sont :

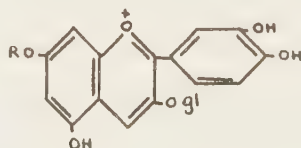
- Acide p. hydroxycinnamique : p. coumarique
- Acide 3 méthoxy 4 hydroxycinnamique : férulique

L'isolement des pigments de cette nature, leur séparation et, finalement, leur identification, se heurtent à leur fragilité.

D'après HARBORNE (36), les liaisons esters des pigments acylés sont plus labiles que les liaisons glycosidiques.

RIBEREAU-GAYON (37) signale leur saponification facile en milieu légèrement alcalin, en cours de précipitation à l'acétate de plomb. HARBORNE (36) affirme encore que leur séparation par chromatographie sur papier est moins commode que pour les anthocyanes simples; les chevauchements des bandes sont fréquents et la purification oblige à des opérations renouvelées. En fait, en dehors des travaux fondamentaux de WILLSTATTER (38) sur la salvianine de la sauge et de KARRER (39) sur la monardéine de la mélisse jaune, il y a peu de renseignements sur les pigments de cette nature dans la littérature d'avant-guerre. En 1936, KURODA et WADA (40) au Japon, isolent des végétaux de cette contrée : la shisonine, la nasunine et la violanine, trois pigments dérivés respectivement du cyanidol et du delphinidol acylés par des groupements p. hydroxycinnamiques.

A la même époque, CHMIELEWSKA (41), étudiant la matière colorante du chou rouge, isole un pigment apparemment homogène (chlorure de rubrobrassicine) et admet dans sa structure la présence d'une molécule de cyanidol à laquelle serait rattachée une molécule d'acide sinapique en 5 ou en 7.



R = Sinapoyl
gl = glucose

Chlorure de Rubrobrassicine d'après Chmielewska

Par la suite, l'isolement d'un deuxième pigment dépourvu d'acide sinapique (chlorure de rubrobrassine) n'a pas apporté d'éléments nouveaux pour l'éclaircissement de la structure (42). Finalement, c'est grâce aux techniques de la chromatographie sur papier que la structure des pigments acylés est mieux connue. GEISSMAN et HARBORNE en 1955 (43) sont les premiers à avoir abordé ce problème et proposé des méthodes.

Dès lors, les progrès sont rapides : ABE et HAYASHI, en 1956 (20), étudiant le comportement chromatographique de la shisonine, de la nasunine et de l'ensatine, montrent que ces trois pigments sont respectivement le p.hydroxycinnamoyl cyanidol, le p.hydroxycinnamoyl delphinidol 3 diglucoside, et le p.hydroxycinnamoyl malvidol 3 diglucoside. De plus, ils font la même observation que HARBORNE (36) : l'acylation accroît le R_f des pigments dans les solvants à base de butanol, tandis que l'on obtient l'effet inverse avec les solvants aqueux.

STROH (9), reprenant le travail de CHMIELEWSKA sur le chou rouge, purifie le chlorure de rubrobrassine par chromatographie sur colonne de cellulose avec de l'acide formique aqueux 0,25%. La structure du pigment isolé par cette technique fait apparaître la présence de cyanidol et de 3 molécules de glucose, ce qui lui fait conclure à une structure cyanidol 3 triglucoside (glucosyl 1 $\rightarrow$ 2 glucosido 1 $\rightarrow$ 2 glucoside). Des pigments de cette nature ont été rencontrés peu de temps auparavant dans *Primula sinensis* sous forme de pelargonidol 3 triglucoside par HARBORNE et SHERRATT (44). Comme le signale HARBORNE (45), l'étude des pigments des Crucifères est particulièrement difficile. Cet auteur a proposé récemment une structure cohérente pour le chlorure de rubrobrassine ainsi que pour les pigments du chou rouge et du radis pourpre (45) (46). Ces derniers sont des dérivés du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside dont le groupement sophorose est estérifié par 1 ou 2 groupements, p.coumarique ou férulique. Les pigments anthocyaniques du radis rose ont une structure très voisine; il s'agit de pigments dérivés du pélagonidol (pelargonidol 5 glucosido 3 sophoroside) acylés par l'acide p.coumarique et l'acide férulique.

BIRKOFER et coll. (47) ont précisé récemment la position des groupements p.coumarique et férulique sur ces pigments; les raphanusines A et B ont pour structures respectives :

- pélagonidol 3 [glucosyl (1 $\rightarrow$ 2) 6 (p.coumaroyl) D.glucosido] 5 glucoside.
- pélagonidol 3 [glucosyl (1 $\rightarrow$ 2) 6 (feruloyl) D.glucosido] 5 glucoside.

Les pigments de la giroflée, autre Crucifère, ont été étudiés par SEYFFERT (48); ils forment un mélange de pigments acylés dérivés d'un cyanidol triglucoside combiné de manière complexe aux acides p.coumarique, férulique et sinapique. Ces structures ont été récemment révisées par HARBORNE (46); ce dernier identifie le

pigment principal de la giroflée au pelargonidol-(3 p. coumaroyl-féruloyl sambubioside) 5 glucoside.

Parallèlement à l'étude des Crucifères, celle des pigments acylés du Pétunia hybride a été entreprise par BIRKOFER et son école (47) (49); après étude systématique d'esters de glucose et de rhamnose dérivés des principaux acides hydroxycinnamiques, ces auteurs ont été amenés à attribuer aux pigments du Pétunia les structures respectives :

pétunidol, malvidol et paeonidol $3 \left[4(p.\text{coumaroyl})\text{rhamnosyl } (1 \rightarrow 6)\text{glucosido} \right] 5 \text{ glucoside}$

CHAPITRE II

SEPARATION ET ISOLEMENT DES PIGMENTS

DU SEIGLE ET DU CHOU ROUGE

Les méthodes de séparation et d'isolement étant les mêmes, nous avons étudié simultanément les pigments du seigle et du chou rouge. Les pigments isolés du seigle et du chou rouge sont des hétérosides qui ont pour aglycone commune le cyanidol. Les pigments des plantules de seigle sont des hétérosides simples tandis que ceux du chou rouge ont une structure hétérosidique acylée par des groupements p.coumarique et férulique.

A. Séparation et isolement des pigments du seigle.

a) Séparation sur colonne de polyamide

L'extrait alcoolique des pigments obtenus d'après la méthode décrite dans la Première Partie est lavé à l'éther éthylique pour le débarrasser des traces de lipides et d'acides organiques. On concentre la solution par évaporation et on la soumet au fractionnement sur une colonne de polyamide Woelm (hauteur : 16,5 cm; diamètre : 2,5 cm) avec le solvant $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (40 : 60) v/v. On observe sur la colonne une zone de mobilité moyenne ($R_f = 0,57$) qui se détache nettement; après examen par chromatographie sur papier Whatman I (n-butanol - acide acétique - eau 4 : 1 : 5), elle apparaît formée de 3 pigments dont les R_f respectifs sont :

S I : 0,41

S II : 0,39

S III : 0,22

b) Chromatographie préparative sur papier épais.

Le fractionnement indispensable des pigments par chromatographie sur papier nous a amené à effectuer d'emblée leur isolement par chromatographie sur papier épais Whatmann 3 MM. Après mise au point de solvants de séparation, nous avons retenu le procédé de fractionnement suivant : 50 ml d'extrait alcoolique concentré sont déposés sous forme de traînées sur 20 feuilles de papier Whatman 3 MM (46,5 x 57 cm); la chromatographie a lieu par voie ascendante avec le solvant acide acétique - eau (15 : 85) v/v à 23° C $\pm$ 2 pendant 16 à 18 heures.

On isole ainsi 3 zones dont 2 intenses correspondant aux pigments : S I ($R_f = 0,43$); S II ($R_f = 0,60$); la troisième peu importante correspond au pigment le moins abondant S III ($R_f = 0,75$).

Les zones sont découpées puis éluées suivant la technique déjà décrite avec le mélange : acide formique aqueux 1,5% - éthanol (1 : 2) v/v.

Pour isoler les pigments S I, S II, S III à l'état pur, il est indispensable de les soumettre à d'autres fractionnements. Les impuretés les plus gênantes sont des sucres, des glycosides flavoniques et des esters d'acides aromatiques que l'on met facilement en évidence par pulvérisation des chromatogrammes avec des réactifs appropriés :

- pour les sucres : phtalate d'aniline (50)

- pour les flavones et flavonols :

$\text{CO}_3\text{N}_{a_2}$ (10%) , complexe diphenylborique (51)

- pour les phénols et les acides phénols :

p. nitraniline diazotée (52)

$\text{Cl}_3\text{Fe} - \text{FeCy}_6\text{K}_3$ (53)

L'examen en lumière visible et U. V. (366 m μ) des chromatogrammes révélés donne une idée précise de l'état de pureté des zones séparées. Les pigments S I et S II ne sont pas accompagnés, dans ces conditions, par des substances gênantes tandis que S III, le moins abondant, entraîne avec lui au cours de sa séparation des glycosides flavoniques.

La purification des 3 pigments a été parachevée par chromatographie ascendante sur papier Whatman 3 MM avec les solvants :

- butanol ter. - acide formique - eau (6 : 1 : 3) v/v

- n-butanol - acide chlorhydrique conc. - eau (7 : 2 : 5) v/v

- acide acétique - eau (30 : 70) v/v

1) Purification du pigment S I

S I contient, à côté de traces de substances étrangères décelables par leur fluorescence en U. V., une petite quantité de pigment S II inévitablement entraîné au moment du découpage des zones chromatographiques. L'élimination de ces impuretés avec le solvant CH_3COOH 30% est facile; l'isolement et l'élution de la zone $R_f = 0,60$ - (Whatman 3 MM) conduisent à un produit pur.

2) Purification du pigment S II

S II est obtenu pur après 2 chromatographies successives sur Whatman 3 MM avec le solvant 6 : 1 : 3.

3) Purification du pigment S III

S III est purifié d'emblée par chromatographie ascendante sur Whatmann 3 MM avec le solvant 6 : 1 : 3. Ce pigment migre lentement ($R_f = 0,21$), ce qui permet aisément de le débarrasser des traces de S II ainsi que des dérivés flavoniques dont la mobilité est plus grande. Un inconvénient cependant : la migration dans le solvant 6 : 1 : 3 est lente; chaque opération nécessite de 2 à 3 jours. S III a été séparé finalement par chromatographie descendante sur Whatman 1 avec le solvant 7 : 2 : 5 en deux pigments très voisins, le second étant un produit de rupture immédiate du premier.

L'élution des pigments purifiés avec le solvant habituel acide formique 1,5% - éthanol (1:2) v/v permet de conserver S I, S II, S III purs en solution au réfrigérateur à -2°C .

4) Comparaison chromatographique de S I, S II, S III dans différents solvants.

Les compositions de la plupart des solvants utilisés pour la chromatographie sur papier ont été relevées dans la littérature; cependant, nous avons préparé les solvants G, H, I pour obtenir de meilleures séparations (tableau III suivant) :

<u>Solvants</u>	<u>Composition</u>	<u>Proportions v/v</u>	<u>Références</u>
A	n-butanol-acide acétique-eau	4 : 1 : 5 (d)	(19)
B	n-butanol-acide acétique-eau	6 : 1 : 2 (m)	(18)
C	acide chlorhydrique conc. -eau	3 : 97 (m)	(19)
D	n-butanol-acide chlorhydrique conc. -eau	7 : 2 : 5 (d)	(20)
E	acide acétique-eau-acide chlorhydrique conc.	15 : 82 : 3 (m)	(19)
F	isopentanol-acide chlorhydrique conc. -eau	21 : 5 : 4 (d)	(20)
G	acide acétique-eau	15 : 85 (m)	
H	butanol ter-acide formique-eau	6 : 1 : 3 (d)	
I	n butanol-acide formique-eau	6 : 1 : 3 (d)	

Papier Whatman I

m : monophasique

d : diphasique

TABLEAU III

En ce qui concerne la chromatographie sur couches minces de cellulose, nous avons surtout utilisé deux solvants que nous avons préparés :

<u>Solvants</u>	<u>Composition</u>	<u>Proportions v/v</u>
J	acide chlorhydrique conc.-acide acétique-eau	3: 1: 20 (m)
K	acide chlorhydrique conc.-acide acétique-eau	280:45:525 (m)

Dans le Tableau IV sont rassemblées les caractéristiques chromatographiques des pigments isolés.

Les R_f sur papier sont donnés à $\pm 0,04$ près, la température de développement étant maintenue constante à $\pm 2^\circ \text{C}$.

Pour les couches minces de cellulose, les R_f sont donnés à $\pm 0,03$ près, à la température moyenne de $20^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$.

Les valeurs indiquées représentent chacune la moyenne d'une vingtaine de déterminations.

Pigment	Valeurs des R_f dans les solvants								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
S I (cyanidol 3 monoglucoside)	0,39	0,28	0,07	0,43	0,26	0,17	0,34	0,60	0,33
S II (cyanidol 3 rhamnoglucoside)	0,38	0,26	0,18	0,50	0,41	0,18	0,47	0,67	0,32
S III (cyanidol 3 rhamnoglucoside ou peut-être cyanidol 7 rham- nosido 3 diglucoside)	0,22	0,14	0,25	0,16	0,51	0,02	0,65	0,62	0,16

Caractéristiques chromatographiques des pigments anthocyaniques des plantules de seigle
 $R_f \pm 0,04$ Whatman n° 1 Température $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$

TABIEAU IVa

S I	S II	S III
Cyanidol 3 monoglucoside R_f	Cyanidol 3 rhamnoglucoside R_f	Cyanidol 3 rhamnoglucoside ou peut-être cyanidol 7 rham- nosido 3 diglucoside R_f
J	0,27	0,34
K	0,61	0,62

Caractéristiques chromatographiques des pigments anthocyaniques des plantules de seigle
 Couches minces de cellulose Température $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ $R_f \pm 0,02$

TABIEAU IVb

B. Séparation et isolement des pigments du chou

Une partie de l'extrait de chou dans le méthanol acide est comparée, avant précipitation à l'acétate de plomb, avec trois extraits E_1 , E_2 , E_3 provenant de la régénération en milieu acide à pH 2 des sels de plomb précipités respectivement à pH 5,5, pH 7, pH 8.

Les extraits sont déposés côte à côte sur le même chromatogramme (Arches 304 - solvant A) pour apprécier l'efficacité du fractionnement préliminaire par précipitation. On constate qu'il n'y a pas d'enrichissement sélectif des fractions E_1 , E_2 , E_3 en pigments particuliers mais qu'au contraire certains d'entre eux ($R_f=0,39$) disparaissent au profit du pigment C_1 ($R_f=0,17$). La zone C_1 croît quand on passe de E_1 à E_3 ; ce résultat confirme les observations de RIBEREAU-GAYON (37) : l'alcalinité de l'acétate de plomb suffit pour provoquer la coupure des groupements esters.

De cette remarque découlent deux observations :

- la structure fondamentale du pigment C_1 se retrouve sous forme acylée dans les pigments complexes de mobilité plus grande.
- pour isoler ces pigments sans les dégrader la méthode par précipitation à l'acétate de plomb ne donne pas entière satisfaction; il est préférable d'opérer selon la méthode que nous avons appliquée à l'extraction des pigments des plantules.

a) Séparation sur colonne de cellulose

Dans un premier essai, l'extrait du précipité E_1 (pH 6) a été fractionné sur colonne de poudre de cellulose Schleicher et Schüll 123 a :

- Poids de cellulose : 105 g
- Hauteur de la colonne : 41 cm
- Diamètre : 4 cm
- Température : $21 \pm 2^\circ\text{C}$
- Solvant d'élution : n-butanol-acide chlorhydrique conc. - eau (7:2:5) v/v.

Nous recueillons au séparateur de fractions 91 fractions de 15 ml; d'après les valeurs de la densité optique de chaque fraction (530 m μ), on établit ensuite le diagramme de fractionnement, ce qui permet d'en rassembler plusieurs et réduit finalement à 6 le nombre des éluats (Fig. 6) :

I	: 42 ml	IV	: 108 ml
II	: 122 ml	V	: 160 ml
III	: 150 ml	VI	: 1000 ml

Les fractions précédentes sont ensuite concentrées par évaporation sous vide à 25°C et soumises à l'analyse par chromatographie sur papier. Les fractions II et

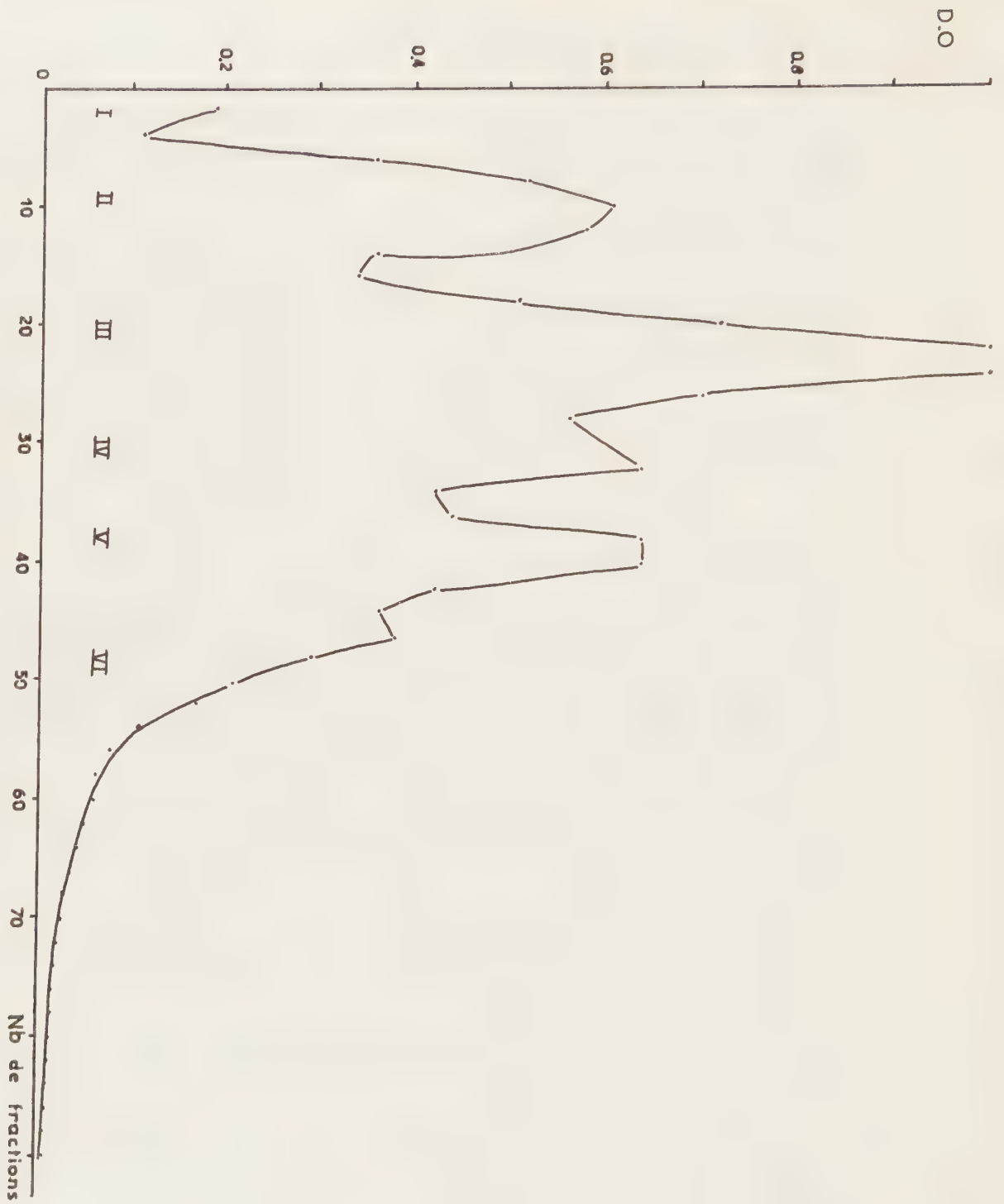


Schéma de fractionnement sur colonne de cellulose

FIG. 6

VI sont les plus intéressantes : la première contient 3 pigments dont un abondant (C_{III}); la seconde en contient également 3 dont deux abondants (C_I et C_{II}). Les fractions II et VI, les moins complexes, nous ont servi à isoler les pigments C_{III} , C_I et C_{II} ; les éluats I, III, IV et V contenant un plus grand nombre de pigments nécessitent d'autres fractionnements; ils ont été de ce fait séparés par chromatographie sur papier épais.

b) Séparation sur colonne de polyamide

Au cours d'un essai de séparation sur colonne de polyamide Woelm :

- Hauteur : 9 cm
- Diamètre : 1,5 cm
- Solvant d'élution : éthanol-eau (10 : 90) v/v

nous avons recueilli 7 fractions colorées dont les constituants ont été identifiés par chromatographie sur papier. Le chevauchement des fractions est moins important que sur colonne de cellulose; les différents éluats ne contiennent qu'un petit nombre de constituants, ce qui donne beaucoup d'intérêt à la méthode. Mais cependant il y a nécessité de recourir à la chromatographie sur papier épais -méthode de résolution plus fine- qui permet d'isoler de chaque fraction les pigments qui la composent. De plus, cette technique permet d'éliminer plus facilement les impuretés qui accompagnent les pigments : sucres, esters de sucre et glycosides, plus mobiles, sont entraînés les premiers par élution.

Dans la IVème Partie de notre travail, nous appliquerons cette méthode en l'adaptant à la technique sur couches minces pour séparer les pigments que nous avons marqués au ^{14}C .

c) Chromatographie préparative sur papier épais

Comme pour les pigments anthocyaniques du seigle, nous avons retenu le même mode de fractionnement par chromatographie préparative sur feuilles de papier épais Whatman 3 MM (57 x 46 cm). L'extrait global de chou en solution propylique après purification à l'éther éthylique et à l'acétate d'isopropyle, est fractionné par chromatographie ascendante avec le solvant B. On obtient 4 zones principales caractérisées : Z_1 , Z_2 , Z_3 , Z_4 .

On observe dans ces conditions une bonne séparation des pigments et de la plupart des substances étrangères qui les accompagnent, dont certaines douées de fluorescence en U. V. : esters d'acides hydroxycinnamiques.

Les zones sont découpées, éluées selon la technique déjà indiquée pour les pigments du seigle avec le solvant acide formique 1,5%-éthanol (1 : 2) v/v. Les zones Z_1 et Z_2 sont purifiées ensuite par chromatographie descendante sur papier Arches 304 avec le solvant B.

ZONE Z_I :

Elle se sépare en 4 pigments principaux que l'on désigne par C_I, C_{II},

C_{III}, C_{IV} :

C _I	0,11	C _{III}	0,19
C _{II}	0,17	C _{IV}	0,22

R_f Solvant B

Le pigment C_I est le plus abondant de cette zone; pour l'obtenir à l'état pur on procède à une nouvelle chromatographie sur papier Whatman I avec HCOOH 0,5% comme solvant.

ZONE Z_{II} :

Outre les pigments rencontrés dans la zone précédente, elle contient surtout du pigment C_{III}.

La purification du pigment C_{III} est effectuée par chromatographies descendantes répétées sur Arches 304 avec le solvant D, puis avec le solvant H, ou par chromatographies sur couches épaisses de cellulose avec le solvant H.

ZONE Z_{III} :

Le pigment C_{III} y est le plus abondant; on observe également des traces de pigments C_I et C_{II}; le pigment C_{IX} s'y trouve en faible quantité. Nous isolons ici encore le pigment C_{III} que nous purifions selon le procédé indiqué ci-dessus. Quant au pigment C_{IX}, on l'obtient à l'état pur par chromatographies descendantes répétées sur Arches 304 avec le solvant D.

ZONE Z_{IV} :

En plus d'une faible proportion de pigment C_{III}, on y rencontre les pigments C_{VI}, C_V et C_{IX}, ces deux derniers étant les plus abondants.

C_V et C_{IX} sont purifiés par chromatographies répétées avec le solvant D sur Whatman I; C_{VI} est séparé des autres pigments et des impuretés qui l'accompagnent par chromatographie descendante sur Whatman I avec le solvant H. Les bandes des différents pigments sont découpées puis éluées avec le solvant HCOOH 1,5% - C₂H₅OH (1 : 2) v/v. Après concentration par évaporation sous vide à 25-30°C, les éluats sont à nouveau chromatographiés avec différents solvants (voir Tableau V) pour s'assurer de leur pureté.

PIGMENT	R _f dans les solvants							
	A	B	C	D	E	H	I	L
C I (cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside)	0,17	0,11	0,55	0,22	0,75	0,24	0,11	0,79
C IV (cyanidol 3 sophoroside)	0,32	0,22	0,38	0,46	0,62	0,51	0,26	
C II (cyanidol 3 - 5 diglucoside)	0,27	0,17	0,17	0,20	0,40	0,25	0,18	0,53
Cyanidol 3 glucoside	0,39	0,28	0,07	0,43	0,26	0,60	0,33	0,37
Cyanidol 5 glucoside		0,34		0,54				
C I ₂			0,57					0,84
C III	0,20	0,16	0,40	0,48	0,73	0,45	0,18	0,78
C IX	0,22			0,62				
C V	0,30			0,75				
C VI	0,33			0,82				
C VIII				0,68				
Cyanidol	0,66	0,49	0,02	0,86				0,19

TABLEAU V_a

PIGMENT	R _f				
	C _I	C _{II}	C _{IV}	Cyanidol 3 glucoside	Cyanidol 5 glucoside
Solvant J	0,63	0,17	0,37	0,08	0,21
Solvant K	0,85	0,62	0,76	0,51	

PIGMENT	R _f				
	C _{III}	C _{IX}	C _V	C _{VI}	Cyanidol
Solvant J	0,52	0,13	0,15	0,15	0,02
Solvant K	0,87	0,84			0,29

TABLEAU V_b

Caractéristiques chromatographiques des pigments isolés du chou rouge et des pigments provenant de l'hydrolyse contrôlée de C I

Tableau Va : Chromatographie ascendante, papier Whatman I. Température 24°C ± 2° C
L: acide acétique glacial-acide chlorhydrique conc. -eau (3:1:8) v/v (20)

Tableau Vb : Chromatographie ascendante sur couches minces de cellulose.
Température : 20° C ± 2° C

Signalons que les pigments sont conservés en solution dans le solvant d'é-lution, à l'abri de la lumière et à une température de -2°C ; ces conditions se prêtent à une meilleure conservation qu'à l'état sec.

Nous avons rassemblé dans le Tableau V_a les caractéristiques chromatographiques sur papier Whatman I des pigments du chou rouge; nous y avons fait figurer aussi les pigments qui proviennent de la coupure par hydrolyse acide de C_I dont la structure fondamentale se retrouve dans les pigments acylés plus complexes. Les résultats des séparations obtenues sur couches minces de cellulose ont été consignés dans le Tableau V_b .

Remarque :

Ce sont finalement les solvants D et J qui nous ont donné les meilleures séparations, le premier sur papier et le second sur couches minces de cellulose. Cependant, l'utilisation des autres solvants (Tableau V) s'est trouvée justifiée à la fois pour vérifier le caractère d'unicité des constituants isolés et pour les confronter aux pigments connus décrits dans la littérature.

Le comportement d' un pigment inconnu dans plusieurs solvants permet de comparer ses propres R_f à ceux de pigments de structure analogue; parfois, une simple confrontation de R_f peut indiquer le nombre de groupements OH ou glycosides contenus dans la molécule, renseignement qui peut être précisé par l'application de la règle de BATE SMITH et WESTALL. (21)

CHAPITRE III

IDENTIFICATION DES PIGMENTS ISOLÉS DU SEIGLE ET DU CHOU

Nous pouvons classer l'ensemble des pigments isolés en deux catégories: les pigments simples contenant une aglycone rattachée à une ou plusieurs molécules de sucres, et les pigments complexes qui possèdent en plus une ou plusieurs molécules d'acides.

Un simple examen comparatif des R_f des pigments isolés dans plusieurs solvants permet de classer la plupart d'entre eux dans une des catégories suivantes :

- 3 monosides
- 3 biosides
- 3 biosido - 5 monosides

Selon HARBORNE (45), la classification des glycosides anthocyaniques actuellement connus est limitée à un petit nombre de types dans lesquels on rencontre le

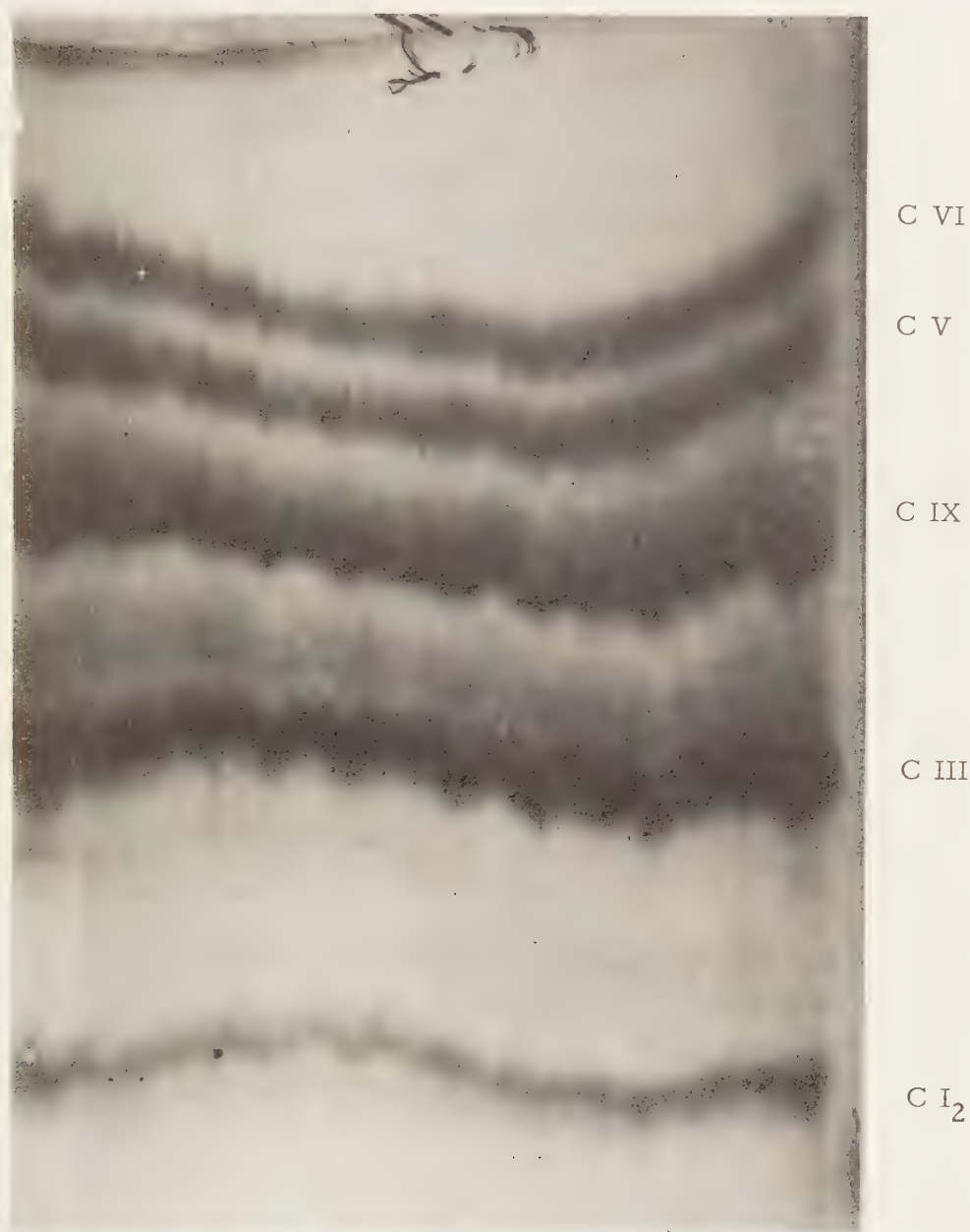


FIG. 7 : SEPARATION CHROMATIQUE DES
PIGMENTS DU CHOU ROUGE

Papier Whatman 1

Solvant : D

plus souvent par ordre de fréquence décroissant :

glucose, galactose, rhamnose, xylose, arabinose.

De plus cet auteur a énoncé quelques observations des plus utiles pour guider l'identification des pigments inconnus :

- le glucose est le sucre le plus souvent rencontré,
- la plupart des 3 biosides contiennent du glucose,
- le sucre en 5 des 3 - 5 diglycosides est toujours du glucose,
- les 3 - 7 diglycosides connus contiennent du glucose.

Il apparaît comme probable que les bioses rencontrés sont en nombre limité; on connaît :

- le rutinose : L rhamnosyl (α 1 $\rightarrow$ 6) D glucose.
- le sambubiose : xylosyl (β 1 $\rightarrow$ 2) glucose.
- le sophorose : glucosyl (β 1 $\rightarrow$ 2) glucose.
- le xylosyl (β 1 $\rightarrow$?) galactose.
- le gentiobiose : glucosyl (β 1 $\rightarrow$ 6) glucose.

De plus, il semble que le nombre maximum de types glycosidiques rencontrés dans une même plante soit limité à trois. Exceptionnellement, il en a été trouvé quatre (45).

Ces considérations générales très précieuses peuvent être complétées par d'autres observations liées à la nature de l'aglycone :

- la couleur en milieu acide varie du rouge orangé pour les dérivés du pélargonidol au rouge violacé pour les dérivés du delphinidol, en passant par le rouge pour les dérivés du cyanidol. Les différences de teintes sont particulièrement accusées sur chromatogrammes développés en milieu acide avec les solvants A, D et J; la coloration dépend presque essentiellement du nombre de OH libres fixés sur le noyau latéral.

- l'utilisation de réactifs chromogéniques appropriés : Cl_3Al à 5% dans l'alcool éthylique et Cl_3Fe aqueux à 2%, permet de distinguer facilement cyanidol, delphinidol et pétunidol des autres aglycones (54).

- de plus, comme l'a précisé RIBEREAU-GAYON (37), les 3-5 diglycosides qui ne possèdent pas deux OH en ortho sur le noyau latéral présentent une fluorescence rouge caractéristique en milieu faiblement acide; en milieu très acide, cette fluorescence se manifeste quand même avec les autres 3 - 5 diglycosides n'ayant pas ce motif structural. La fluorescence est donc caractéristique de la position 5 occupée par un sucre : en effet, les 3 glycosides ne sont pas fluorescents.

A. Etude structurale des anthocyanosides

Les pigments purifiés sont conservés, comme nous l'avons déjà dit, en solution dans le solvant d'élution H COOH 1,5% - $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (1 : 2) v/v et au frais. Pour en faire l'étude structurale, une partie de la solution est évaporée sous vide à l'évaporateur rotatif à une température de l'ordre de 20-25° C pour en chasser le méthanol; le résidu aqueux est ensuite lyophilisé pour obtenir le pigment sec.

L'étude structurale du pigment est poursuivie par dégradation sélective pour en déterminer les éléments essentiels :

- aglycone .
- sucres.

L'hydrolyse acide totale du pigment permet d'identifier simultanément l'aglycone et les oses qui y sont rattachés. Il est nécessaire ensuite d'indiquer la nature et la position des liaisons glycosidiques sur l'aglycone. En particulier, il convient d'identifier les bioses ou trioses normalement rattachés au pigment.

a) Identification des aglycones

1. Chromatographie

0,5 à 1 mg de pigment est dissous dans 0,3 à 0,5 ml d'acide chlorhydrique 7,26 N préalablement distillé; la solution est ensuite portée à l'ébullition au bain-marie pendant 20 minutes sous atmosphère d'azote. Après refroidissement, l'anthocyanidol est extrait avec le minimum d'alcool isoamylique : 3 à 5 ml sont suffisants pour entraîner la totalité de l'aglycone dans la phase amylique. Ces opérations sont facilitées par l'utilisation du micromatériel : ballons et erlenmeyers de 5 ml, ampoules à décanter de 20 ml.

La phase aqueuse est mise de côté pour la détermination des oses résultant de l'hydrolyse totale du pigment; la phase amylique est évaporée sous vide (2mm Hg à 60° C) dans un ballon de 5 ml monté sur un évaporateur rotatif. L'évaporation n'est pas poussée jusqu'à dessiccation complète; elle est arrêtée lorsque le volume résiduel de la solution est de 0,05 ml environ. Cette solution est ensuite déposée sur papier Whatman I ou sur couches minces de cellulose pour déterminer la nature de l'aglycone par comparaison avec des témoins.

Dans le Tableau VI, nous avons rassemblé les caractéristiques chromatographiques sur papier et sur couches minces de cellulose du pélargonidol, cyanidol, paeonidol et delphinidol. Sur papier nous avons utilisé les solvants "Forestal" (eau-acide acétique-acide chlorhydrique conc. 10 : 30 : 3 v/v) (55) et de ROUX (acide formique 90% -acide chlorhydrique 3 N 1 : 1 v/v) (56); sur couches minces de cellulose, nous employons les solvants J et K déjà indiqués pour la séparation des pigments du seigle et du chou (Tableaux IV et V).

Remarque : Le solvant de ROUX convient également pour l'identification des aglycones sur couches minces de cellulose.

Anthocyanidols	Whatman I R _f		Couches minces de cellulose R _f	
	Solvants		Solvants	
	Forestal	Roux	J	K
Pelargonidol	0,67	0,34	0,06	0,47
Cyanidol	0,50	0,25	0,02	0,29
Paeonidol	0,62	-	0,01	0,40
Delphinidol	0,31	0,12	0,00	0,20

R_f des anthocyanidols sur papier et sur couches minces de cellulose

TABLEAU VI

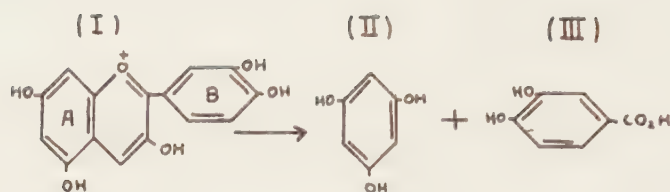
2. Spectres d'absorption dans le visible

Pour faciliter l'identification et le dosage des aglycones (nous nous sommes limité au cyanidol qui est l'aglycone commune à l'ensemble des pigments isolés), nous traçons le spectre d'absorption dans le Visible de la solution amylique provenant de l'hydrolyse totale des pigments. L'alcool isoamylé saturé de ClH 7,26 N sert de référence. Le maximum d'absorption du cyanidol est situé à $550 \text{ m}\mu \pm 2 \text{ m}\mu$ avec un coefficient d'extinction moléculaire $\epsilon = 34.000 \pm 5\%$. Ce mode opératoire convient parfaitement pour le dosage du cyanidol; après hydrolyse complète des pigments, il est inutile de concentrer la solution amylique : celle-ci, amenée à un volume connu (3 ou 5 ml), permet d'obtenir directement le spectre d'absorption.

3. Microdégradation alcaline

Les anthocyanidols d'origine naturelle sont en nombre limité; leur structure paraît bien établie, à l'exception de la roséidine (7-3' diméthoxy cyanidol ?).

L'hydrolyse ou la fusion alcaline (37) (57) permettent de couper la molécule avec formation de phloroglucinol et d'acide aromatique caractéristique du noyau latéral (Schéma 2)



Hydrolyse alcaline du Cyanidol

SCHEMA 2

Nous avons appliqué la méthode de RIBEREAU-GAYON au cyanidol (I) et avons obtenu du phloroglucinol (II) et de l'acide protocatéchique (III) identifiés par chromatographie sur papier Whatman I par comparaison avec des témoins :

$$R_f \text{ phloroglucinol} = 0,60$$

$$R_f \text{ acide protocatéchique} = 0,68$$

Solvant A de REIO (58) : méthyl isobutyl cétone - acide formique - eau (1000 ml de méthyl isobutyl cétone sont agités avec 100 ml d'acide formique aqueux à 4 %).

Après révélation à la paranitraniline diazotée (52), la tache du phloroglucinol présente une coloration brun rougeâtre tandis que l'acide protocatéchique donne une tache jaune qui vire au gris bleu après pulvérisation de CO_3Na_2 à 15 %.

Le rendement de l'opération n'est pas excellent : il y a formation de produits de dégradation qui sont révélés en brun avec le réactif précédent.

b) Identification des sucres

La phase aqueuse résultant de l'hydrolyse complète des pigments est trop acide pour permettre une identification directe des sucres. La neutralisation de la solution aqueuse a été obtenue par deux procédés différents.

1) Hydrolyse des pigments et purification des solutions aqueuses de sucres.

- Procédé à la di n octyl méthyl amine

La solution est neutralisée par combinaison de ClH avec un échangeur d'ions liquide et basique dont les caractères lyophile et lyophobe permettent, avec le chloroforme l'extraction facile du chlohydrate formé. Les sucres plus solubles dans l'eau demeurent en totalité dans la phase aqueuse surnageante. Nous utilisons pour cette opération la di n octyl méthyl amine (59).

La solution aqueuse acide diluée à 5 ml avec de l'eau dans une ampoule à décanter de 20 ml est agitée avec la quantité juste suffisante de di n octyl méthyl amine pure pour amener le pH entre 8 et 9. Les dernières traces de pigment servent d'indicateur coloré; on extrait ensuite le chlorhydrate et l'amine en excès avec du chloroforme. Après décantation de la phase aqueuse, on élimine les traces de chlorhydrate et d'amine par extraction continue de la solution avec du chloroforme. L'opération se fait dans un microextracteur liquide/liquide et dure 1 heure. La phase aqueuse purifiée est ensuite séparée du chloroforme émulsionné par centrifugation.

- Procédé par électrodialyse

Après décantation de la solution chloroformique enrichie en chlorhydrate et en amine, la partie aqueuse diluée à 8 ml avec de l'eau est introduite dans le compartiment intermédiaire d'un électrodialyseur à membranes échangeuses d'ions (60). Il suffit généralement de 40 à 50 mn pour débarrasser la solution des ions gênants. Au début de l'opération : $I = 50 \text{ mA}$, $V = 60 \text{ V}$. L'électrodialyse est arrêtée lorsque l'intensité du courant tend à s'annuler. Ce procédé permet d'obtenir des solutions aqueuses de sucres très propres.

Il est possible de simplifier ce procédé : la solution aqueuse de sucres diluée avec 5 ml d'eau distillée est partiellement neutralisée avec $\text{Na OH } 2 \text{ N}$ jusqu'à pH 5-6; elle est ensuite introduite dans le compartiment central de l'électrodialyseur et l'électrolyse est menée de la même façon que précédemment. Cependant, il faut compter 3 à 4 heures pour éliminer la totalité de ClH et ClNa . On obtient aussi dans ces conditions d'excellents résultats.

2) Identification des sucres par chromatographie sur papier et sur couches minces.

La solution de sucres purifiée est ensuite lyophilisée. Le résidu sec est repris avec le minimum d'eau ($100 \mu\text{l}$). Cette solution est chromatographiée pour l'identification des oses hydrolysés; nous utiliserons à la fois la chromatographie sur papier et sur couches minces de cellulose ou de Kieselgel G.

Les résultats obtenus ont été rassemblés dans les Tableaux VII_a et VII_b. Nous y avons fait figurer les expressions R_f , R_g , R_{g2} ainsi que les couleurs après révélation avec des réactifs chromogéniques appropriés.

Les caractéristiques des sucres simples et des holosides présentant un intérêt pour l'étude des pigments anthocyaniques et des extraits végétaux dont on les a tirés ont été groupées dans les mêmes tableaux VII_a et VII_b.

L'utilisation de plusieurs solvants et de réactifs chromogéniques différents permet de confirmer la nature des sucres identifiés par comparaison avec des témoins.

SUCRES	J R _G 24 heures	K R _G 24 heures	L R _F 24 heures	Diphényl Amine + p.Anisidine	Naphtorésorcine	Phtalate d'aniline
Glucose	1,00	1,00	0,16	Brun foncé	Bleu clair	Brun clair
Galactose				Brun foncé	Bleu clair	Brun clair
Fructose	1,18	1,14	0,21	Marron	Brun rougeâtre	
Rhamnose		1,37	0,40	Jaune	Bleu vert	Brun clair
Fucose			0,32	Jaune	Bleu vert	Brun clair
Xylose			0,28	Brun foncé + Bleu	Bleu violacé	Rouge cerise
Arabinose				Brun foncé + Bleu	Bleu violacé	Rouge cerise
Cellobiose (β 1 $\rightarrow$ 4)		0,53		Brun foncé	Bleu clair	
Gentiobiose (β 1 $\rightarrow$ 6)	0,37	0,38		Brun foncé	Bleu clair	
Maltose (α 1 $\rightarrow$ 4)		0,58		Brun foncé	Bleu clair	
Sophorose (β 1 $\rightarrow$ 2)	0,62	0,62		Brun foncé	Brun rougeâtre	
Saccharose	0,70	0,70		Brun marron	Brun rougeâtre	
Rutinosé (α 1 $\rightarrow$ 6)	0,72				Bleu clair	
Raffinose	0,27	0,27			Brun rougeâtre	

J : N Butanol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5) diphasique

K : N Butanol - benzène - Pyridine - eau (5 : 1 : 3 : 3) diphasique

L : N Butanol - éthanol - eau - ammoniacale (40 : 10 : 49 : 1) diphasique

Papier Whatman N° 1

R_G : exprime la valeur du rapport déplacement du sucre considéré
T = 24° ± 2°C déplacement du glucose témoin

CHROMATOGRAPHIE DES SUCRES SUR PAPIER

TABLEAU VII_a

Sucres	Cellulose		"Kieselgel G" Merck		Diphényl Amine + p. Anisidine	Naphtrésorcine *	Diphényl Amine + Aniline	Chlorhydrate de Cystéine
	M R _f 2h30	N R _{G2}	O R _f 2h30	P R _f 3h30				
Glucose	0,38	1,00	0,37	0,40	Brun foncé + bleu	Bleu clair	Vert olive	Bleu
Galactose	0,35	0,90	0,35	0,32	Brun foncé + bleu sale	Bleu clair		Violet
Fructose	0,45	1,11			Brun clair	Rouge brique (Pourpre)	Brun	Bleu foncé
Rhamnose	0,62	1,62	0,57	0,58	Jaune	Bleu-vert	Jaune	
Fucose	0,48	1,44				Bleu-vert		
Xylose	0,50	1,30	0,46	0,52	Brun foncé	Bleu-mauve (Mauve)	Vert olive	Violet rouge
Arabinose	0,45		0,43	0,37		Bleu-mauve (Mauve)		Violet rouge
Cellobiose (β 1 $\rightarrow$ 4)	0,26	0,56	0,23		Brun foncé + bleu	Bleu clair	Bleu clair	
Gentibiose (β 1 $\rightarrow$ 6)	0,20	0,50	0,17		Brun foncé + bleu	Bleu clair	Bleu clair	
Maltose (α 1 $\rightarrow$ 4)			0,23	0,27		Bleu clair	Bleu clair	
Sophorose (β 1 $\rightarrow$ 2)	0,30	0,65			Brun clair	Rouge-pourpre (Pourpre)	Brun	
Saccharose	0,32		0,25			Rouge brique	Brun sale	
Rutinosé (α 1 $\rightarrow$ 6)	0,14	0,83	0,27			Bleu clair	Bleu	
Raffinose			0,10			Rouge brique		

* Les couleurs indiquées entre parenthèses sont obtenues par pulvérisation de Naphtrésorcine sur couches minces de "Kieselgel G" tamponnées à l'acide borique.

M : N Butanol - pyridine - eau (6 : 4 : 3) monophasique

N : N Butanol - éthanol - eau - ammoniacale (40 : 10 : 49 : 1) diphasique

O : Méth. Ethyl Cétone - Acide acétique - méthanol (6 : 2 : 2) pour couches de "Kieselgel G" tamponnées avec de l'acide borique - monophasique

P : N butanol - acétone - eau (5 : 4 : 1) - monophasique

R_{G2} : Les valeurs indiquées ont été obtenues par double développement, par rapport au déplacement du glucose choisi comme témoin, pour une migration 2 x 18 cm du front du solvant.

CHROMATOGRAPHIE DES SUCRES SUR COUCHES MINCES

TABLEAU VII_b

Pour déceler les sucres et préciser leur position sur les chromatogrammes, nous utilisons de préférence les réactifs :

- Naphtorésorcine (61)
- Phtalate d'aniline (50)
- Diphénylamine / p. anisidine (62)
- Diphénylamine / aniline (62)

Ces trois réactifs ont une bonne sensibilité; ils permettent de distinguer facilement les sucres simples : pentoses, hexoses, méthylpentoses.

D'autres réactifs moins employés ont été utilisés pour distinguer les sucres d'une même catégorie :

Le chlorhydrate de cystéine (63) permet de différencier glucose et galactose, tandis que les réactifs à la diphénylamine (diphénylamine / p. anisidine et diphénylamine/aniline (62) conviennent bien pour distinguer les diholosides possédant des liaisons $1 \rightarrow 2$ ou bien $1 \rightarrow 4$ et $1 \rightarrow 6$. Des différences de teintes caractéristiques ont été obtenues avec la diphénylamine/aniline sur couches de Kieselgel G, tamponnées avec de l'acide borique ainsi que sur couches de cellulose.

Nous nous sommes procuré la plupart des sucres témoins dans le commerce. Le rutinose et le sophorose ont dû cependant être isolés en quantités réduites de leurs glycosides : rutine (quercétol 3[L rhamnosyl ($\alpha 1 \rightarrow 6$) Dglucoside]) et sophoraflavonoloside (kaempférol 3 [D glucosyl ($\beta 1 \rightarrow 2$) D glucoside]). Le rutinose a été obtenu de deux manières différentes : par hydrolyse enzymatique de la rutine avec la rhamnodiastase isolée de graines de Bourdaine (Rhamnus frangula) et par dégradation oxydative de la rutine au MnO_4K selon la méthode de CHANDLER et HARPER (64).

Le sophorose provient de l'oxydation permanganique d'un échantillon de sophoraflavonoloside extrait de *Sophora japonica* (65) et purifié sur colonne de polyamide avec CH_3COOH 15% .

Les valeurs des R_f et des R_g sur couches minces sont données à titre indicatif; toutefois, les valeurs obtenues avec le solvant M sur couches de cellulose présentent une bonne reproductibilité. C'est pourquoi nous avons souvent utilisé cette dernière méthode pour les identifications de routine. De même, le solvant M conduit à d'excellentes séparations : nous l'avons utilisé pour différencier, par la méthode du double développement, pentoses et méthylpentoses (xylose, fucose, rhamnose).

L'identification du rutinose et du sophorose a été faite par chromatographie sur papier avec des solvants connus (45), (66), ce qui nous a permis ensuite de préciser leurs caractéristiques en chromatographie sur couches minces de cellulose et de Kieselgel G, avec les solvants M, N, O,

c) Nature des liaisons osidiques

1. Dosages de l'aglycone et des sucres

Il s'agit maintenant de déterminer le nombre de molécules de sucres rattachés à l'aglycone du pigment. On dose l'aglycone et les sucres après hydrolyse complète des pigments.

- Dosage de l'aglycone :

L'aglycone est dosée directement après hydrolyse du pigment par spectrophotométrie d'absorption de la solution amylique d'extraction dans le visible.

Après hydrolyse, les extraits amyliques sont dilués à 5 ml avec de l'alcool amylique saturé de ClH 7,26 N.

La concentration en cyanidol des extraits amyliques a été déterminée d'après l'absorption des solutions à 550 mμ.

- Dosage des sucres :

Nous avons dosé les sucres par la méthode de LEOPOLD (67) qui est adaptée à la détermination de faibles quantités de l'ordre de 1 à 200 μg.

Les hexoses possèdent un maximum d'absorption à 365 mμ avec une inflexion à 475 mμ; les pentoses absorbent à 350 mμ avec un maximum secondaire moins important à 450 mμ. Les méthylpentoses ont un maximum d'absorption à 370 mμ et une absorption négligeable à 540 mμ, ce qui permet de contrôler éventuellement les résultats quantitatifs de l'analyse chromatographique.

Les ϵ sont respectivement de :

- glucose	$\epsilon = 7,7$	10^6	Mole/ml/cm.
- xylose	$\epsilon = 6,2$	10^6	Mole/ml/cm.
- rhamnose	$\epsilon = 12,8$	10^6	Mole/ml/cm.

Mode opératoire

L'extrait de sucres lyophilisé est additionné de :

- 0,5 ml d'eau.
- 2 ml d'une solution d'acide p.aminobenzoïque à 1,3% dans l'acide acétique glacial.
- 2 ml d'une solution d'acide phosphorique à 1,3% dans l'acide acétique glacial.

Le mélange est maintenu au bain-marie pendant une heure; après refroidissement, l'absorption est mesurée à 360 mμ au spectrophotomètre avec la solution à blanc comme référence. Dans le cas de plusieurs sucres, il est nécessaire auparavant de les séparer par chromatographie sur couches minces de cellulose avec le solvant N par simple ou double développement.

On procède au grattage puis à l'élution des zones par extraction de l'adsorbant à l'eau distillée, dans un tube d'Alhln (verre fritté n° 3). On élue en même temps une partie du support de la chromatoplaque étendu sur une surface sensiblement égale à celle des zones où sont localisés les sucres pour servir de référence. Cet extrait, traité de la même manière que les solutions de sucres, sert de standard pour corriger l'absorption des échantillons.

Dans le cas simple où l'analyse chromatographique révèle la présence seulement de deux sucres, il est plus commode de les doser globalement. Ces sucres provenant de l'hydrolyse acide des pigments sont dans un rapport molaire simple : on peut facilement comparer leur absorption à celle de mélanges de sucres témoins de rapports molaires semblables. Ces binaires témoins sont préparés en fonction de la quantité d'aglycone trouvée dans l'hydrolysat.

Ainsi, l'analyse chromatographique du cyanidol 3 rutinoside révèle la présence de glucose et de rhamnose; on prépare en solution aqueuse les témoins binaires suivants :

1 glucose + 1 rhamnose

2 glucose + 1 rhamnose

1 glucose + 2 rhamnose

Sucres provenant du pigment et sucres témoins sont ensuite comparés par la méthode précédente; on vérifie que l'absorption de l'échantillon est identique à celle du binaire : 1 glucose + 1 rhamnose. Nous avons fait figurer dans le Tableau VIII les résultats des dosages des principaux pigments anthocyanosides étudiés.

2. Points d'attache des groupements glycosidiques sur l'aglycone.

Comme le remarque HARBORNE (68), (45), tous les anthocyanosides simples présentent une absorption analogue dans l'U. V. C'est seulement dans le Visible qu'apparaissent des différences notables dans les absorptions.

Cet auteur a observé pour les 3-glycosides un épaulement distinct du maximum d'absorption entre 410 et 450 mμ tandis que les 5 glycosides et les 3 - 5 diglycosides présentent dans cette même région une absorption approximativement moitié de celle des 3 glycosides correspondants.

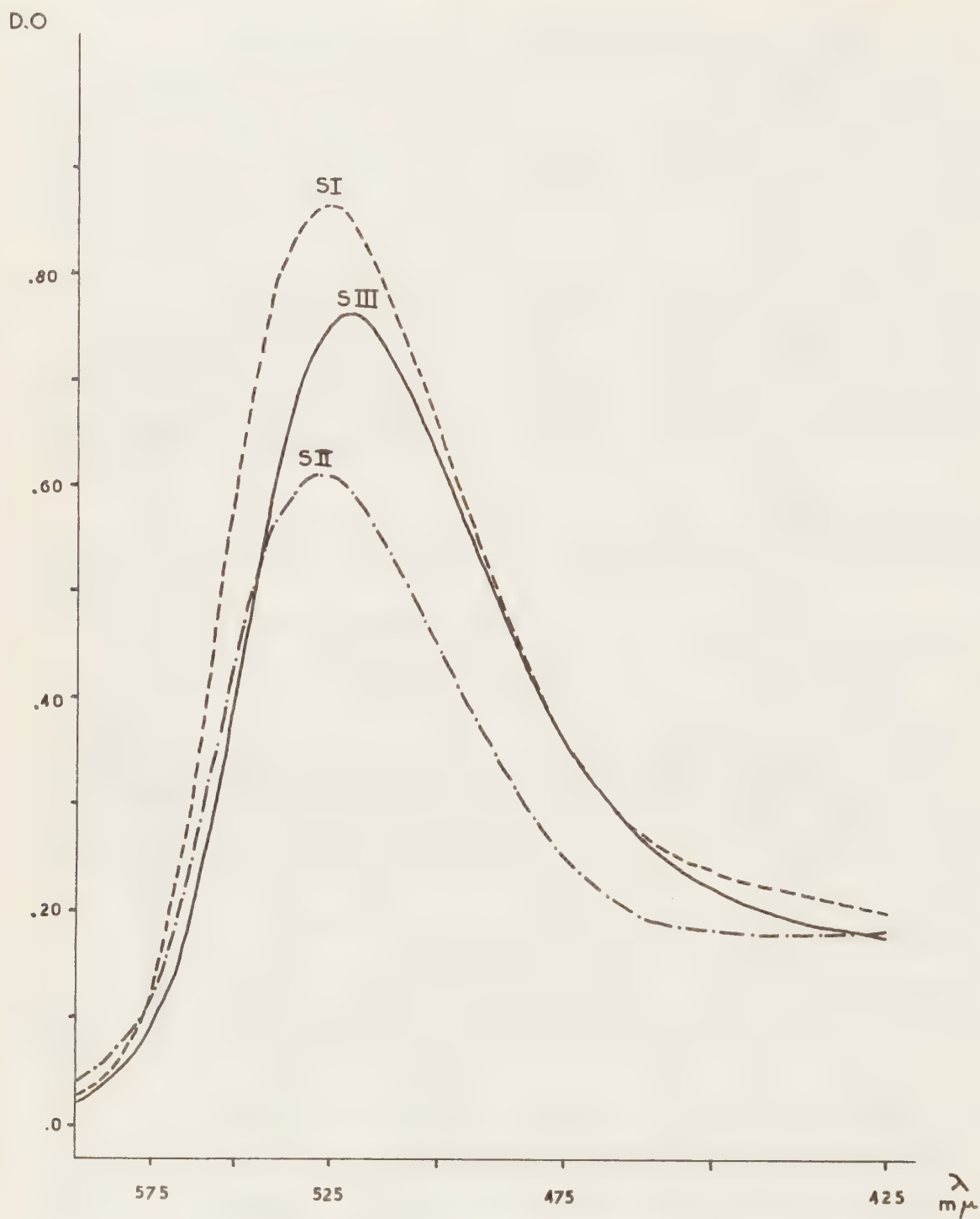
Il y a là un moyen simple pour distinguer les pigments possédant un OH libre en 5.

Pour faciliter l'identification, HARBORNE a proposé d'établir le rapport des absorptions entre une λ arbitrairement choisie (440 mμ) et le maximum d'absorption Visible du pigment dans le méthanol 0,01% ClH.

Pigment	D. O du pigment en solution dans $\text{CH}_3\text{OH}-\text{ClH } 0,01\%$	Volume de l'échantillon en ml	Teneur en cyanidol 10^{-6} moles/ml	Teneur en sucres 10^{-6} moles/ml	Moles de sucres Mole de cyanidol
S I (cyanidol 3 glucoside)	1,05	10	0,272	Glucose : 0,294	1,08
S II (cyanidol 3 rhamno - glucoside)	1,59	10	0,426	Glucose : 0,387 Rhamnose:0,387	0,91 0,91
S III (cyanidol 3 rhamno -di- glucoside ou peut-être cyanidol 7 rhamnosido 3 diglucoside)	0,74	10	0,200	Glucose : 0,430 Rhamnose:0,215	2,15 1,07
C I (cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside)	1,57	10	0,414	Glucose : 1,18	2,85

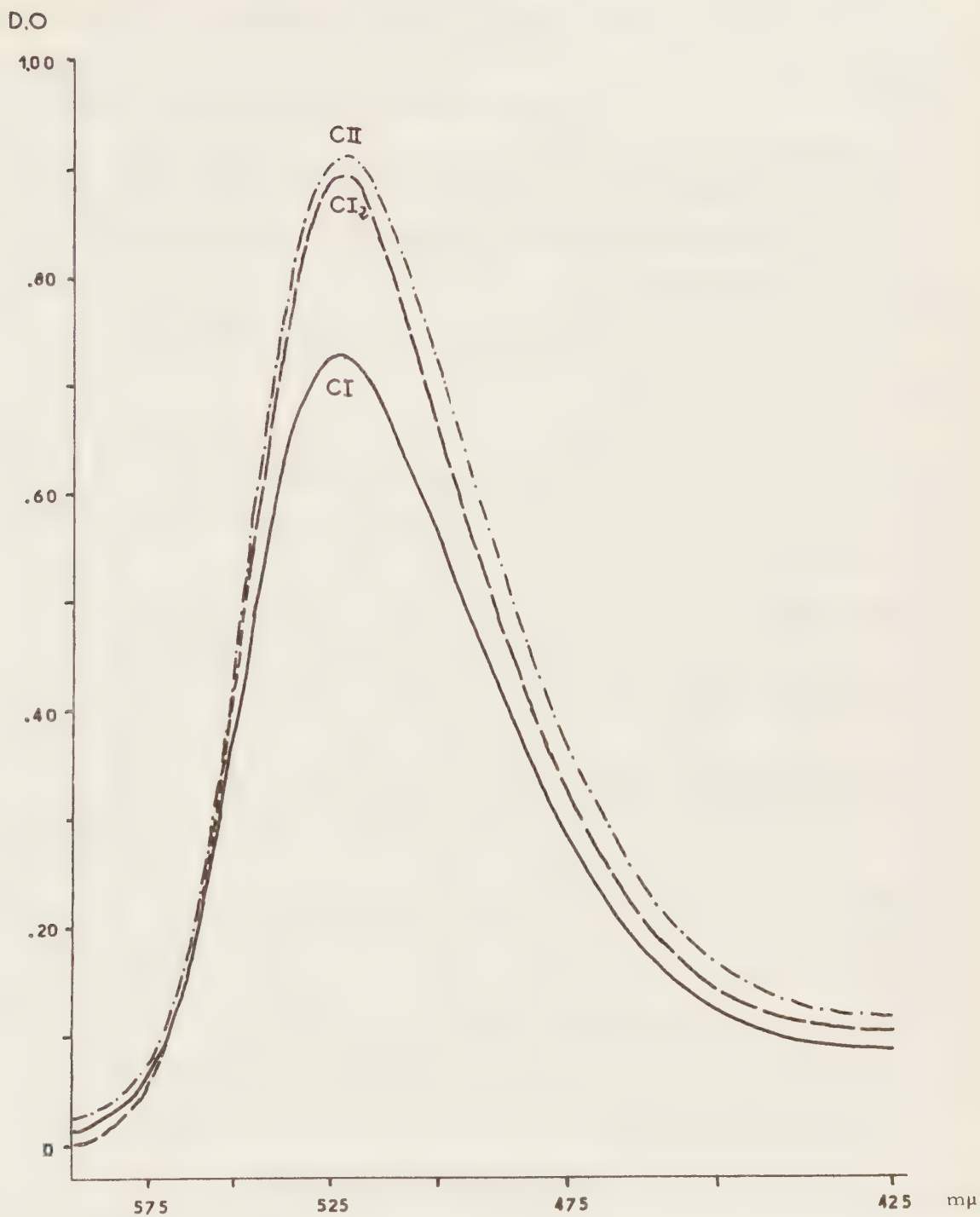
Dosage des sucres dans les anthocyanosides S I, S II, S III, C I.

TABLEAU VIII



Spectres des anthocyanosides des plantules de seigle

FIG. 8



Spectres des pigments CI, CI₂, CII du chou rouge

FIG. 9

Il ressort de l'établissement du rapport $\frac{E_{440 \text{ m}\mu}}{E_{\text{Max. Vis.}}}$ que l'on peut distinguer aisément :

- trois types de glycosides dérivés d'une même aglycone : 3-glycosides, 5 et 3-5 glycosides, 7 et 3-7 glycosides.
- les glycosides de même type dérivés d'aglycones différentes.

Pour une étude d'ensemble du problème, nous nous sommes reporté à la publication d' HARBORNE (45).

Dans le Tableau IX, nous avons résumé les caractéristiques spectrales des anthocyanosides du seigle et du chou.

Pigment	Maximums d'absorption en m μ		E 440 m μ
	λ_1	λ_2	E λ_1
S I (cyanidol 3 glucoside)	525	281	0,24
S II (cyanidol 3 rhamnoglucoside)	525	282	0,23
S III (cyanidol 3 rhamno diglucoside ou cyanidol 7 rhamnosido 3 diglucoside)	520	282	0,23
C I (cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside)	523	279	0,13
C II (cyanidol 3-5 diglucoside)	522	279	0,13

TABLEAU IX

3. Hydrolyse acide contrôlée des pigments

L'hydrolyse acide ménagée des pigments selon la technique préconisée par ABE et HAYASHI (20) et appliquée par HARBORNE (69) et nous-mêmes, fournit des renseignements sur le nombre et la nature des fragments colorés qui en résultent. Leur identification par chromatographie sur papier et sur couches minces permet d'attribuer au pigment d'origine une structure déjà très élaborée; la coupure est progressive et se fait par détachement successif des molécules de sucres jusqu'à la formation finale d'aglycone. L'hydrolyse est effectuée en milieu chlorhydrique 2 N pendant 3 heures à 70°C.

On suit le processus de coupure par prélèvements successifs, toutes les demi-heures, du milieu réactionnel ; chaque prise d'essai est analysée par chromatographie pour identifier les pigments formés.

La vitesse de coupure des groupements glycosidiques dépend à la fois de leur nature et de leur position sur l'aglycone : les 3 monosides sont plus stables que les 5 ou les 7 monosides. C'est pourquoi la fragmentation est plus ou moins progressive et sélective.

Dans le Tableau X nous avons fait figurer, pour chaque type d'anthocyanoside, les différents pigments provenant de leur hydrolyse acide contrôlée.

Mode opératoire.

Pour identifier l'ensemble des pigments intermédiaires, l'hydrolyse a été conduite suivant deux procédés :

- le procédé le plus simple consiste à dissoudre 4 à 5 mg de pigment sec dans 0,5 ml de ClH 2 N, puis à porter la solution concentrée dans un bain maintenu à 80° C pendant 3 heures. L'hydrolyse est menée sous atmosphère d'azote dans un microballon de 2 ou 5 ml. A l'aide d'une micro-pipette, ou d'une microséringue, on fait des prélèvements de 10 µl après 1/4 d'heure, 1/2, 1, 2, 3, 4 heures.

Les 10 µl successifs sont déposés sur papier ou sur couches minces de cellulose. De préférence, on emploie pour la chromatographie sur papier Whatman I le solvant D, et sur couches minces de cellulose le solvant J.

- l'hydrolyse ménagée a été effectuée aussi en solution dans le mélange méthanol-dioxane (1:1) v/v - 0,5% ClH conc. sous atmosphère d'azote à 80° C pendant 4 heures.

Cette technique permet une hydrolyse progressive; on obtient les mêmes résultats que par la méthode précédente. Un avantage pourtant : les taches sont plus nettes et les pigments intermédiaires, ainsi que le cyanidol, se dégradent moins vite qu'en milieu aqueux. Il est nécessaire toutefois de n'utiliser que du dioxane purifié.

- nous avons obtenu l'hydrolyse ménagée des 3-5 diglycosides par chauffage en milieu CH₃COOH-Eau (10 : 90) v/v à 95°C pendant 1 heure.

Dans ces conditions, la liaison glycosidique en 5 est coupée de préférence, ce qui permet d'isoler facilement le 3 glycoside correspondant. Ainsi, après 1 heure d'hydrolyse acétique du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside, nous avons trouvé à côté du pigment initial non transformé du cyanidol 3 sophoroside et une faible quantité de cyanidol 3-5 diglucoside. Il est avantageux d'appliquer aussi cette technique aux pigments acy-

Anthocyanoside	Pigments fragmentaires formés au cours de l'hydrolyse ménagée	Nombre de pigments
3 monoside	3 monoside + aglycone	2
3 bioside	3 bioside + 3 monoside + aglycone	3
3 trioside normal	3 trioside + 3 bioside + 3 monoside + aglycone	4
3 trioside ramifié	3 trioside + 3 bioside _a + 3 bioside _b + 3 monoside + aglycone	5
3 - 5 dimonoside	3 - 5 dimonoside + 3 monoside + 5 monoside + aglycone	4
3 bioside 5 monoside	3 bioside 5 monoside + 3-5 dimonoside + 3 bioside + 3 monoside + 5 monoside + aglycone	6
3 bioside 7 monoside	3 bioside 7 monoside + 3-7 dimonoside + 3 bioside + 7 monoside + 3 monoside + aglycone	6

Hydrolyse acide contrôlée des principaux anthocyanosides naturels connus

TABEAU X

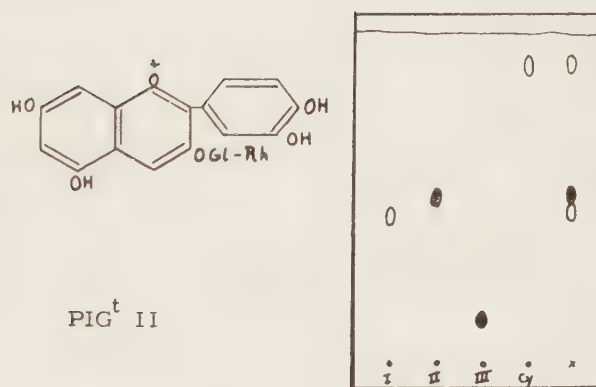
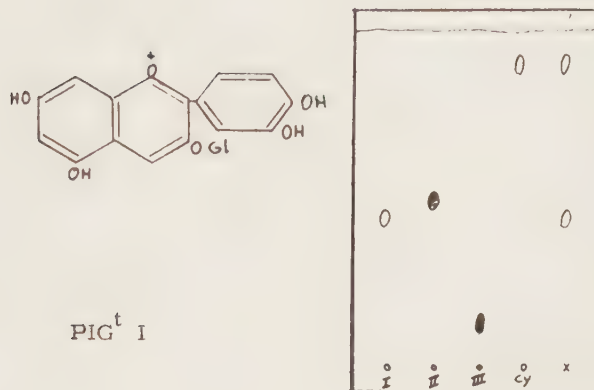
HYDROLYSE MENAGEE

FIG. 10 : SCHEMA DE L'HYDROLYSE ACIDE CONTROLEE
DU CYANIDOL 3 GLUCOSIDE (I) ET DU CYANIDOL
3 RHAMNOGLUCOSIDE (II)

Papier Whatman n° 1

Solvant D

lés possédant une molécule de sucre en 5 : dans le cas d'un 3-5 diglycoside acylé sur le groupement rattaché en 3 à l'aglycone, on obtient un 3 glycoside acylé.

Dans le Tableau XI, nous avons schématisé l'hydrolyse ménagée du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside en fonction du temps dans le milieu méthanol-dioxane-ClH 0,5%.

Durée de l'hydrolyse en heures	Pigments formés en cours d'hydrolyse				
	cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside.	cyanidol 3 sophoroside.	cyanidol 3-5 diglucoside.	cyanidol 3 monoglucoside + cyanidol 5 mono-glucoside non séparés	cyanidol
0,5	++++	+++	+	+	traces
1	+++	++	+++	++	+
2	+	+	++	++++	++
3	traces	traces	+	++++	+++
4			traces	++	++++

Hydrolyse acide ménagée du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside

Milieu réactionnel : méthanol-dioxane (1 : 1) v/v - 0,5% ClH

Température : 80° C

Chromatographie sur couche mince de cellulose - solvant K

TABLEAU XI

d) Identification des groupements glycosidiques en 3

1. Oxydation des pigments par l'eau oxygénée

KARRER et de MEURON (71) ont isolé, après traitement de la malvine (malvidol 3-5 diglucoside) par H_2O_2 , un composé cristallisé, la malvone, dans lequel le glucose rattaché initialement à l'aglycone en 3 se trouve lié maintenant au reste de la molécule par une liaison ester. Bien que les auteurs, dès cette époque, aient préconisé cette réaction pour identifier les sucres rattachés en 3 à l'aglycone, ce n'est que récemment qu'elle a trouvé une application intéressante.



FIG. 11 : HYDROLYSE ACIDE CONTROLEE DU CYANIDOL
5 GLUCOSIDO 3 SOPHOROSIDE (↑).

Papier Whatman I

Solvant : C

CHANDLER et HARPER (64) ont adapté la réaction de KARRER à l'oxydation de quantités de pigments de l'ordre du milligramme : après l'hydrolyse de l'ester formé en milieu ammoniacal, on récupère le sucre que l'on peut identifier par les méthodes classiques. BIRKOFER et KAISER (72) ont proposé une modification à cette méthode qui permet d'opérer sur une quantité de pigments de l'ordre de 0,5 à 1 mg. Nous avons utilisé cette technique pour l'identification de groupements glycosidiques en 3 (cyanidol 3 sophoroside) en l'adaptant à la chromatographie sur couches minces de cellulose avec CH_3COOH 15% comme solvant.

L'oxydation par le $\text{Mn O}_4\text{K}$ ou l'ozone permet de couper tous les groupements glycosidiques de la molécule en 3, 5 ou 7 sans provoquer leur fragmentation. Ces deux méthodes moins sélectives que la précédente donnent des résultats analogues avec les anthocyanosides : elles ont été proposées par CHANDLER et HARPER (64). Nous avons utilisé ces deux procédés, choisissant de préférence l'oxydation par le Mn_4OK pour des raisons de rapidité.

2. Oxydation permanganique

Mode opératoire

2 à 3 mg de pigment sont dispersés dans le mélange 0,7 ml d'acétone + 0,1 ml de NH_4OH 0,1 N; on ajoute 0,3 ml de $\text{Mn O}_4\text{K}$ 0,5 N, puis le mélange est abandonné pendant 45 mn à température ambiante (pH voisin de 7). Pour arrêter l'oxydation et éliminer l'excès de $\text{Mn O}_4\text{K}$, nous ajoutons ensuite au mélange réactionnel 0,1 ml d'acide formique 5 N.

La solution se décolore en 10-15 mn; on lui ajoute 1 ml d'eau distillée puis on soumet la suspension formée à une centrifugation pendant 3 mn. Le surnageant parfaitement limpide et incolore est électrodialysé et desséché par lyophilisation.

L'identification des sucres présents est précisée par chromatographie (se référer aux méthodes déjà décrites).

Remarque :

Nous avons amélioré la méthode de CHANDLER et HARPER en remplaçant le réducteur formaldéhyde par HCOOH ; l'utilisation de ce dernier évite la formation de résines gênantes. Par cette méthode, nous avons pu identifier sans difficulté le sophorose du cyanidol 3 sophoroside, le glucose et le sophorose du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside, le rutinoside du cyanidol 3 rhamnoglucoside.

3. Hydrolyse enzymatique

Une préparation enzymatique de rhamnodiasase à partir de graines de Bourdaine (*Rhamnus frangula*) a été obtenue par le procédé de CHANDLER et HARPER (64)

nous l'avons utilisée pour caractériser sélectivement le groupement rhamnoglucosyl du cyanidol 3 rutinoside.

Mode opératoire.

1,3 mg de pigment S II en solution dans 0,2 ml d'eau est traité avec 0,05 ml de suspension enzymatique (10 mg de la préparation précédente dans 0,2 ml d'eau); puis on laisse reposer le mélange obtenu pendant deux jours à température ambiante. Après réaction, la suspension est centrifugée et le surnageant desséché par lyophilisation.

L'extrait est chromatographié en même temps qu'une partie aliquote de la préparation enzymatique, ce qui permet de mettre en évidence le rutinose (L Rhamnosyl α 1 $\rightarrow$ 6 D glucose) (voir caractéristiques chromatographiques indiquées Tableau VII).

B. Etude structurale des pigments acylés

La difficulté de l'étude structurale des pigments acylés s'ajoute à celle des problèmes déjà rencontrés pour leur séparation et leur purification. Cette étude a été abordée récemment par HARBORNE (46), BIRKOFER (47), WEBB (73) et KOEPPEN (74); elle fait l'objet d'une grande activité.

a) Détermination de la nature des groupements acylés

La plupart des pigments de cette nature (nous l'avons déjà vu) contiennent des groupements acylés dérivés des acides hydroxycinnamiques : acide p. coumarique, acide férulique. L'identification de ces groupements est basée sur la saponification des fonctions esters dans lesquelles ils sont engagés. Généralement, on traite le pigment acylé avec une lessive alcaline (Na OH 2 N) pendant 1 à 2 heures sous atmosphère d'azote (75), (72), (37). Les acides sont éliminés sous forme de sels de Na tandis que la coupure libère l'anthocyanoside : ce dernier est étudié par les méthodes indiquées au chapitre précédent.

Les acides régénérés par traitement avec ClH sont extraits à l'éther éthylique et analysés par chromatographie.

Dans notre façon de procéder, nous avons remplacé pour l'extraction l'éther éthylique par l'acétate d'isopropyle. Dans ces conditions, nous observons une meilleure stabilité de l'anthocyanoside résultant.

Mode opératoire :

1 à 2 mg de pigment lavé préalablement à l'acétate d'isopropyle pour en éliminer les traces d'acides libres sont traités par 0,2 ml de Na OH 2N pendant 2 heures sous azote (pH $\geq$ 10). Après réaction, la solution alcaline est neutralisée avec ClH 2N et amenée à pH 1.

Les acides libérés sont extraits à l'acétate d'isopropyle dans une micro-ampoule à décanter de 25 ml. Les extraits sont rassemblés, évaporés à sec; le résidu obtenu est dissous dans le volume minimum de CH₃OH pour l'analyse chromatographique. La solution aqueuse résiduelle est lyophilisée; le produit sec contient à côté de l'anthocyanoside un excès de ClNa dont il faut le débarrasser. Ce résidu est lavé plusieurs fois avec C₂H₅OH absolu; la solution alcoolique est ensuite concentrée par évaporation, puis déposée sur couches minces de cellulose pour l'identification par chromatographie (solvant J). Dans ces conditions, le pigment désacylé et débarrassé de ClNa peut être facilement élué avec le mélange acide formique 1,5% - C₂H₅OH et isolé à l'état pur. Une simple confrontation des R_f de ce pigment avec ceux du pigment initial permet de confirmer la désacylation.

b) Identification des principaux acides phénols par chromatographie et électrophorèse.

Les acides phénols combinés aux pigments anthocyaniques les plus fréquemment rencontrés sont :

- l'acide p. coumarique
- l'acide caféique
- l'acide férulique

Les méthodes actuelles de séparation et d'identification des acides phénols sont fondées sur l'utilisation de plusieurs techniques :

- chromatographie sur papier et sur couches minces,
- électrophorèse sur papier et sur couches minces,
- chromatographie en phase gazeuse.

I. Méthodes générales de séparation et d'identification d'acides phénols d'origine naturelle.

L'identification des acides hydroxycinnamiques résultant de la coupure des pigments acylés a été effectuée à la fois par chromatographie et par électrophorèse. D'autres acides phénols existant dans les extraits de seigle et de chou ont été étudiés simultanément ainsi que certains acides hydroxybenzoïques provenant de la microdégradation alcaline des anthocyanidols.

- Chromatographie

Nous avons opéré par :

-chromatographie sur papier Whatman I d'après les indications d' IBRAHIM et TOWERS (76) avec les solvants : benzène - acide acétique glacial - eau (6 : 7 : 3) v/v, formiate de Na - acide formique - eau (10 : 1 : 200).

-chromatographie sur couches minces de polyamide avec les solvants : acétate d'éthyle - acide acétique glacial (95 : 5) v/v, acide acétique 30%.

Nous avons décrit cette technique dans un travail antérieur pour l'identification des acides phénols des grains d'orge (77).

-chromatographie d'adsorption sur couches de Kiesel - gel G d'après la technique de PASTUSKA (78) avec le solvant : benzène - dioxane - acide acétique glacial (90 : 25 : 4) v/v.

La révélation des taches est obtenue avec trois réactifs chromogéniques différents qui donnent avec ces acides des colorations typiques :

- Cl_3Fe , 6 H_2O 2% dans l'eau.
 - $\text{Cl}_3\text{Fe} + (\text{Fe Cy}_6) \text{K}_3$ (réactif de BARTON) (53).
 - p.nitraniline diazotée (52) : les couleurs obtenues avec ce réactif sur couches de polyamide sont beaucoup plus caractéristiques que sur papier.
- De plus, les acides hydroxycinnamiques présentent des fluorescences typiques par irradiation U. V. (336 mμ).

- Electrophorèse

L'identification des acides hydroxybenzoïques par électrophorèse sur couches minces de Kieselgel G a donné aussi de très bons résultats. Nous nous sommes inspiré de la technique de PASTUSKA et TRINKS (79).

Nous conduisons l'électrophorèse selon les indications définies dans la première partie :

tampon pyridine-acide acétique-eau (25 ml : 10 ml q.s. 2,500 ml).
 pH = 5,3 85 V/cm - 2 mA/cm.
 Durée : 1 h. à 1 h 30.

Les acides migrent vers l'anode; ils sont révélés avec les réactifs précédents.

L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau XII.

La présence simultanée dans un extrait d'acide p.coumarique, férulique et sinapique rend difficile leur identification. Les méthodes précédentes et celles présentées récemment dans la littérature (80) (81) ne permettent pas de séparer nettement acide férulique et acide sinapique : c'est pourquoi nous avons essayé de mettre au point une méthode de séparation pour faciliter leur purification et leur identification.

Acides benzoïques	R_{f_a}	M_S	Coloration Cl ₃ Fe 2 %	Acides hydroxycinnamiques	R_{f_a}	M_S	Coloration Cl ₃ Fe 2 %
Veratrique	0,67	0,61	Brun	p. Coumarique	0,49	0,70	Jaune orangé
Vanillique	0,57	0,72	Brun clair	Férulique	0,55	0,60	Brun clair
Salicylique	0,66	1,00	Brun violet	Sinapique	0,50	0,47	Brun rosé
Syringique	0,54	0,63	Brun	Caféique	0,21	0,61	Gris vert
p. hydroxybenzoïque	0,53	0,78	Brun clair	Chlorogénique	0,00	0,27	Vert
Protocatéchique	0,29	0,74	Gris violacé				
Gallique	0,13	0,70	Gris				
2-5 dihydroxy- benzoïque	0,35	1,01	Violet				

$R_{f_a} = R_i$ des acides phénols dans le solvant: benzène-dioxane-acide acétique glacial (90 : 25 : 4) v/v
sur Kieselgel G d'après la méthode de PASTUSKA (78)

M_S = Mobilités relatives par rapport à l'acide salicylique choisi comme témoin. Ces valeurs sont
constantes à $\pm 0,05$ près.

Kieselgel G ; tampon pH = 5,3

Conditions électriques : 85 V/cm. 35 mA.

Durée : 1 h à 1 h 30.

R_i et Mobilités électrophorétiques relatives (M_S) de quelques acides phénols

TABIEAU XII

2. Séparation et Identification des acides p.coumarique, férulique et sinapique.

Nous avons opéré de deux manières différentes pour résoudre ce problème :

- chromatographie sur couches minces de cellulose.
- électrophorèse sur papier.

1° Chromatographie sur couches minces de cellulose

Nous utilisons des chromatoplaques de cellulose de grandes dimensions (45 x 20 cm), ce qui conduit à un cheminement plus long des substances à séparer. Le mélange p.coumarique, férulique, sinapique, est séparé dans le solvant acide acétique, acide chlorhydrique, eau (3:1:20) v/v par voie ascendante dans une cuve de verre pour chromatographie sur papier. Le développement dure 7 heures; dans ces conditions, la séparation des trois couples d'isomères cis-trans est excellente.

Dans le Tableau XIII nous avons résumé les caractéristiques des 3 acides séparés.

Acide	Trans			Cis		
	R _f	Coloration		R _f	Coloration	
		p. nitraniline diazotée + CO ₃ Na ₂	Cl ₃ Fe + FeCy ₆ K ₃		p. nitraniline diazotée + CO ₃ Na ₂	Cl ₃ Fe + Fe Cy ₆ K ₃
p.Coumarique	0,35	Violet	Bleu	0,58	Violet	Bleu
Férulique	0,27	Vert foncé	-	0,54	Vert-bleu	-
Sinapique	0,24	Rose orangé	-	0,49	Rose orangé	-

Solvant : CH₃COOH-ClH conc. -H₂O (3:1:20) v/v.

Distance parcourue par le front du solvant : 38 cm.

R_f des acides hydroxycinnamiques dans le solvant J.

TABLEAU XIII

Remarque :

Pour identifier les acides p.coumarique, férulique, sinapique, (cis-trans) dans un mélange d'acides plus complexe, il est intéressant, après dépôt sur la plaque, d'exposer le mélange au rayonnement ($\lambda=366\text{ m}\mu$) d'une lampe à vapeur de Hg Philips HPW 125 (366 m μ) pendant 10 mn.

Les acides trans sont partiellement transformés en isomères cis ; par comparaison avec le mélange initial non irradié, il est facile après chromatographie d'identifier les 3 couples d'isomères. La lumière solaire favorise nettement cette transformation; c'est pourquoi il est difficile d'apprécier rigoureusement les quantités d'isomères cis et trans en mélange. Il est donc nécessaire d'opérer à l'obscurité.

2° Electrophorèse

L'électrophorèse est effectuée sur papier Whatman 4 (47 x 18 cm) avec le tampon pyridine,acide acétique,eau pH 5,3, 38 V:cm, 35 mA.Dans ces conditions,la durée de l'opération est de 5h20 à l'obscurité.

Les acides migrent vers l'anode et se séparent parfaitement; ils sont révélés en bleu au réactif de BARTON. Les mobilités relatives des 3 acides exprimées par rapport à l'acide p.hydroxyphénylpropionique témoin sont les suivantes :

Acide	Mobilités relatives M_R exprimées par rapport à l'acide p.hydroxyphényl propionique	
	Trans	Cis
p. Coumarique	0,78	1,25
Férulique	0,53	1,05
Sinapique	0,39	0,85
p.Hydroxyphényl-propionique	1,00	1,00

Tension : 1800 V

Intensité : 20 mA

Durée de l'électrophorèse : 1 h 30

Distance parcourue par le témoin p.hydroxyphényl propionique : 14,9 cm

Mobilités relatives des acides hydroxycinnamiques sur Whatman 4

TABLEAU. XIV

c) Dosage des acides hydroxycinnamiques

Il s'agit d'établir maintenant le nombre de molécules d'acide rattachées à la molécule d'anthocyanoside . Les acides hydroxycinnamiques ont une absorption caractéristique dans le proche U. V, dans la région 300-330 mμ. Ces acides éthyléniques sont susceptibles d'exister sous deux formes stéréoisomères cis et trans. Dans le Tableau XV nous avons rassemblé les caractéristiques des deux formes .

Acide	Trans		Cis	
	Max. d'absorption en m μ	$\epsilon \pm 5\%$	Max. d'absorption en m μ	$\epsilon \pm 5\%$
p. Coumarique	310	23.200	304	18.100
Férulique	323	19.200	320	16.500
Sinapique	322	18.000	320	12.600

TABLEAU XV

Solvant : méthanol 0,01 % ClH

Concentrations : $2 \cdot 10^{-2}$ g/l et $1 \cdot 10^{-2}$ g/l.

Caractéristiques spectrales des acides hydroxycinnamiques
dans l'U. V. moyen

Les acides cis ont été obtenus par chromatographie sur couches minces de cellulose (solvant J) après irradiation des formes trans en solution dans le méthanol à l'aide d'une lampe à vapeur de Hg. Philips H P W 125 (366 m μ).

1) Dosage des acides hydroxycinnamiques libres en solution

Après hydrolyse alcaline des pigments acylés, on mesure l'absorption des acides en solution dans un volume connu de CH₃OH - ClH 0,01 %.

La présence de produits de dégradation non identifiés rend généralement nécessaire la séparation préalable des acides par chromatographie (papier Whatman I, solvant 6:7:3). On élue au méthanol la zone correspondant à l'acide , évapore à sec et reprend avec un volume connu de CH₃O H - ClH 0,01 % pour déterminer la concentration de la solution en utilisant le ϵ approprié.

2) Dosage direct

Comme l'a fait remarquer HARBORNE (68), l'absorption des anthocyanosides dans la région 300 - 350 m μ passe par un minimum de forme étalée :

- pélargonidol 3 - 5 diglucoside

$$E_{325 \text{ m}\mu} = 0,06 \times E_{505 \text{ m}\mu}$$

- cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside

$$E_{325 \text{ m}\mu} = 0,10 \times E_{525 \text{ m}\mu}$$

ce qui permet de distinguer facilement les anthocyanosides des pigments acylés dont les groupements hydroxycinnamoyl absorbent dans cette région.

Il s'ensuit que l'absorption dans cette région dépend directement du nombre de groupements acylés rattachés à l'anthocyanoside. Le rapport des extinctions $\frac{\text{Max } 300-330 \text{ m}\mu}{\text{Max visible}}$ dépend à la fois de la nature des groupements acylés et de leur nombre.

Pour appliquer cette méthode, nous avons préparé des solutions témoins dans le $\text{CH}_3\text{OH} - \text{ClH } 0,01 \%$ contenant respectivement : 1 mole de cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside et 1,2,3 moles des différents acides hydroxycinnamiques (Tableau XVI).

Nature du mélange : pigment + acides hydroxycinnamiques	E Max.acide		Max. dans $\text{CH}_3\text{OH}-\text{ClH } 0,01 \%$ en m μ
	E 523 m μ	pigment	
Cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside (C I)	0,10	a	- - 523
C I + 1 p.coumarique	0,66		310 - "
C I + 2 p.coumarique	1,20		310 - "
C I + 1 férulique	0,54		322 - "
C I + 2 férulique	0,94		322 - "
C I + 1 sinapique	0,48		324 - "
C I + 2 sinapique	0,86		324 - "

TABLEAU XVI

a : dans le cas du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside non acylé
0,10 exprime le rapport des extinctions $\frac{\text{E } 325 \text{ m } \mu}{\text{E } 523 \text{ m } \mu}$

La comparaison de ces rapports simples avec celui du pigment isolé permet de connaître le nombre de groupements acylés qui lui sont rattachés.

Remarque :

L'hydrolyse alcaline des pigments acylés du chou fournissant presque exclusivement des acides hydroxycinnamiques trans, nous n'avons tenu compte que de cette forme stéréoisomère pour établir les différents rapports du tableau XVI.

d) Position des groupements acylés sur la molécule d'anthocyanoside

Bien que les OH de l'aglycone et des sucres offrent plusieurs possibilités de fixation des groupements esters, en fait seuls les OH des sucres sont estérifiés. Il est facile de voir en effet que dans les pigments acylés dérivés du cyanidol 5 glucosido 3 sopho-

roside, les OH de l'aglycone en 7 - 3' - 4' ne sont pas substitués par des groupements acylés.

L'addition de deux gouttes d'une solution de Cl_3Al à 5% dans le méthanol à 5 ml d'une solution de pigments C III, C IX, C V, C VI dans CH_3OH - 0,01 % ClH provoque un glissement bathochromique du maximum d'absorption de 15 à 20 $\text{m}\mu$.

Ce déplacement du maximum d'absorption visible d'après GEISSMAN et coll. (82) est l'indication de deux OH libres en position ortho; les groupements 3', 4' ne sont donc pas substitués. Les pigments dont l'OH en 7 est substitué ont leur maximum d'absorption visible déplacé d'environ 6 $\text{m}\mu$ vers le violet (45) par rapport à celui du pigment correspondant dans lequel l'OH en 7 est libre.

Ce n'est pas le cas des pigments C III, C IX, C V et C VI dont les maximums d'absorption respectifs sont légèrement déplacés vers le rouge par rapport à celui du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside (Tableau XVII). Il est donc probable que tous ces pigments ont des fonctions esters sur leurs groupements glycosidiques (46).

Trois méthodes permettent de localiser les fonctions esters sur les molécules de sucres :

1) hydrolyse acide contrôlée selon BIRKOFER et coll. (47) : les groupements glycosidiques acylés sont détachés de l'aglycone et identifiés séparément.

Pigments	Maximas en $\text{m}\mu$ dans CH_3OH - 0,01 % ClH			Rapports	
	λ_1	λ_2	λ_3	$\frac{E_{440 \text{ m}\mu}}{E_{\lambda_1}}$	$\frac{E_{\lambda_2}}{E_{\lambda_1}}$
C I	523	-	279	0,13	0,10
C I ₂	523	-	279	0,13	0,10
C III	525	331	280	0,14	0,77
C IX	530	328	280	0,16	0,92
C V	525	326	280	0,20	0,60
C VI	525	310	280	0,17	0,70
C VIII	530	330	-	0,26	0,60

TABLEAU XVII

Caractéristiques spectrales des pigments du chou

2) oxydation par H_2O_2 des pigments : les groupements glycosidiques acylés fixés en 3 sont sélectivement coupés et identifiés comme de simples groupements glycosidiques, par la méthode de CHANDLER et HARPER (64) (72).

3) méthylation : la méthylation des groupements OH non substitués de l'édifice complexe conduit, par hydrolyse ultérieure, à des sucres méthylés. L'identification de ces derniers permet de préciser l'emplacement des fonctions esters.

Plusieurs méthodes ont été proposées :

- méthylation par $SO_4(CH_3)_2$ en présence de CO_3Na_2 selon KARRER et WIDMER (83)
- méthylation par ICH_3 dans la diméthylformamide en présence d' Ag_2O
- méthylation par le diazométhane en solution dans CH_2Cl_2 en présence d'éthérate de BF_3 selon la technique de WEBB et coll. (73)
- méthylation par ICH_3 dans la diméthylformamide en présence de LiH selon la méthode de BIRKOFER et coll. (47).

Application de la méthylation à la détermination structurale du pigment C III.

Après les essais préliminaires avec les 3 premières méthodes, nous avons appliqué la technique de BIRKOFER modifiée à la détermination structurale du pigment C III.

Mode opératoire.

Dans un tube de 180 x 10 mm, on introduit 35 mg de pigment C III en solution dans 1 ml de diméthylformamide, 0,25 ml d' ICH_3 et 50 mg de LiH.

Le tube scellé au chalumeau est ensuite maintenu pendant 20 h à 60° C dans un bain à température constante. Après ouverture du tube, le pigment méthylé est extrait plusieurs fois avec $CHCl_3$. La solution chloroformique évaporée à sec, on hydrolyse le résidu avec un mélange $CH_3OH - ClH$ conc. (4 : 1) v/v par chauffage à reflux au bain marie bouillant pendant 10 heures. Après refroidissement, on ajoute 5 ml d'eau au mélange réactionnel, puis CH_3OH est chassé par évaporation.

La solution aqueuse résiduelle est ensuite chauffée à reflux pendant 20 heures. Après refroidissement, on la soumet à l'électrodialyse pour en éliminer ClH et les traces de $ClLi$. La solution obtenue est lyophilisée et le résidu sec est repris avec 0,020 ml d'eau pour en faire un dépôt sur une feuille de papier Whatman I préalablement tamponnée avec $ClNH_4$ 2 %.

Les sucres méthylés obtenus sont séparés par la méthode de PETEK (84) avec le solvant isooctane - isopropanol - NH_4OH 10 % (65 : 25 : 2) v/v en présence de 2, 3, 4, 6 tétraméthyl glucose et de 3, 4, 6 triméthylglucose comme témoins. Ce dernier a été obtenu par perméthylation suivie d'hydrolyse du sophora flavonoloside selon la méthode indiquée précédemment. Il est indispensable de saturer la feuille de papier pendant 24

heures; la migration a lieu par voie ascendante. Le chromatogramme est ensuite révélé comme le préconise cet auteur à l'oxalate d'aniline selon PARTRIDGE (50).

Plusieurs taches apparaissent différemment colorées en rouge cerise et en brun clair (tableau XVIII).

Sucre méthylé	R_G	Coloration oxalate d'aniline
2, 3, 4, 6 tétraméthyl glucose	1,00	Rouge cerise
3, 4, 6 triméthyl glucose	0,66	Brun clair
2, 3, 4 triméthyl glucose	0,55	Rouge cerise
diméthyl glucose	0,17	Rouge cerise
glucose	0,03	Brun clair

TABLEAU XVIII

R_G : Valeurs exprimées par rapport à la migration du
tétraméthyl 2, 3, 4, 6 glucose.

Les taches de $R_G = 1,00$ et $R_G = 0,55$ sont identifiées respectivement au tétraméthyl 2, 3, 4, 6 glucose et au 2, 3, 4 triméthyl glucose, tandis que les taches de $R_G = 0,66$ et $R_G = 0,17$ peuvent être attribuées : la première au 3, 4, 6 triméthylglucose, la seconde à un diméthylglucose non identifié.

L'identification du 2, 3, 4 triméthylglucose et du 2, 3, 4, 6 tétraméthyl glucose permet d'attribuer au pigment C III une structure acylée avec un groupement féruloyl en position 6 sur la deuxième molécule de glucose du groupement sophorosyl, ou en position 6 sur le glucose en 5. La deuxième molécule d'acide férulique occupe l'une des positions 3, 4, ou 6 du glucose directement rattaché à l'OH en 3 de l'aglycone. Pour lever l'indétermination, nous avons fait subir au pigment CIII une hydrolyse acétique pendant 1 heure avec $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 10 % selon la technique que nous avons décrite pour les anthocyanosides.

On obtient dans ces conditions un nouveau pigment C VIII dérivé du cyanidol 3 sophoroside qui comporte 2 molécules d'acide férulique, la molécule de glucose en position 5 ayant été coupée sélectivement. On peut donc affirmer que la molécule d'acide férulique est rattachée au groupement sophorose et occupe la position 6 du glucose le plus éloigné de l'aglycone.

Coupure périodique

Pour préciser la position 3, 4 ou 6 de la deuxième molécule d'acide féruli-

que sur le glucose le plus proche de l'aglycone, nous avons oxydé 52 mg de pigment C III à l'aide de 213 mg de métapériodate de Na selon la méthode de BIRKOFER et KAISER (47). Le mélange de polyols formé est chromatographié par voie ascendante sur couche de Kieselgel G avec le solvant acétate d'éthyle - acide formique - eau (100 : 20 : 32) v/v. Après révélation au réactif métapériodate de Na-benzidine, on identifie le glycérol. Il est donc probable que la deuxième molécule d'acide férulique occupe la position 6 sur la molécule de glucose la plus proche de l'aglycone.

De ce fait, nous pouvons préciser aussi la structure du pigment C VIII, il contient une molécule de glucose de moins que C III (schéma 4).

C. OBSERVATIONS ET CONCLUSIONS SUR L'ETUDE STRUCTURALE DES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES DU SEIGLE ET DU CHOU ROUGE

a) Anthocyanosides des plantules de seigle :

D'après l'étude précédente, nous pouvons attribuer aux pigments du seigle les structures suivantes :

- Pigment S I :

L'analyse indique un mole de glucose pour un mole de cyanidol; d'autre part, l'hydrolyse acide contrôlée permet d'obtenir directement du cyanidol. Le comportement chromatographique du pigment S I dans plusieurs solvants est identique à celui du cyanidol 3 glucoside décrit dans la littérature. De plus, son spectre d'absorption dans le Visible et dans l'U.V. lui font attribuer la structure 3 glycoside.

Le pigment S I n'est autre que le cyanidol 3 glucoside. (schéma 3).

- Pigment S II :

Ce pigment contient du cyanidol, du glucose et du rhamnose dans la proportion 1 : 1 : 1. L'hydrolyse acide contrôlée (Fig.9) montre que l'on a affaire à un bioside. Son spectre d'absorption dans le visible (Fig.8) confirme une structure 3 bioside. Pour préciser la nature du groupement bioside, nous avons hydrolysé ce pigment avec de la rhamnodiaxase; l'identification de rutinose permet d'attribuer à ce pigment la structure cyanidol 3 $\left[\text{L rhamnosido } (\alpha 1 \rightarrow 6) \text{ D glucoside} \right]$.

De plus, le comportement chromatographique dans plusieurs solvants est en accord avec les données de la littérature. (Tableau IV).

Nous avons apporté à cet ensemble de concordances une confirmation complémentaire : les propriétés chromatographiques et spectrales du pigment S II sont les mêmes que celles du pigment obtenu par réduction électrolytique d'un échantillon de rutine (quercétol 3 rutinoside) (voir 3ème partie).

- Pigment S III :

La présence de deux molécules de glucose et d'une molécule de rhamnose font de ce pigment un cyanidol trioside (tableau VIII). Le spectre d'absorption Visible (Fig.8) permet de lui attribuer soit une structure 3 triosidique, soit une structure 3 - 7 diglycosidique. Cette dernière paraît la plus vraisemblable; les 3 - 7 diglycosides présentent par rapport aux 3 glycosides ayant la même aglycone, un glissement hypsochromique caractéristique de 6 à 9 m μ (45).

Le rapport $\frac{E_{440 \text{ m } \mu}}{E_{\text{Max. Vis.}}}$ indique une position 5 non substituée; de plus, l'addition de Cl_3Al provoque un glissement bathochromique de + 20 m μ du maximum d'absorption qui confirme l'absence de substituants en 3' - 4'.

L'identification du cyanidol 3 glucoside parmi les pigments plus simples résultant de l'hydrolyse acide contrôlée montre que la position 3 est substituée au moins par une molécule de glucose. La présence d'un pigment de $R_f = 0,46$ (solvant D) attribué au cyanidol 3 diglucoside permet d'envisager deux structures provisoires :

- cyanidol 7 rhamnosido 3 diglucoside.
- cyanidol 3 rhamnoglucosido glucoside.

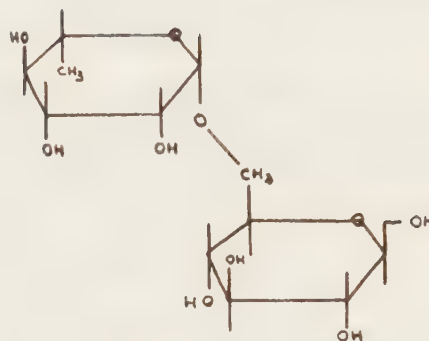
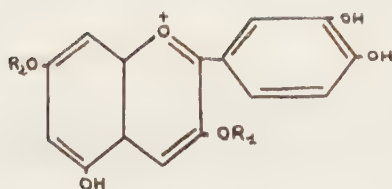
Nous ne pouvons pas retenir l'éventualité d'une structure comportant en 3 un groupement triosidique ramifié; d'après HARBORNE et HALL (85), un pigment de cette nature (cyanidol 3-2 G glucosyl rutinoside) a des caractéristiques différentes du pigment S III. Le pigment S III étant le moins abondant des anthocyanosides des plantules de seigle, nous n'avons pas pu en isoler suffisamment pour en faire une étude plus approfondie et identifier le groupement glycosidique en 3.

Ci-dessous, nous avons récapitulé les résultats de notre étude sur l'identification des pigments du seigle :

<u>Pigment</u>	<u>Identification</u>
S I	cyanidol 3 monoglucoside
S II	cyanidol 3 rhamnoglucoside (3 rutinoside)
S III	cyanidol 3 rhamnodiglucoside ou peut-être cyanidol 7 rhamno- -sido 3 diglucoside.

b) Anthocyanosides du chou

Selon la méthode d'extraction choisie (acétate de plomb ou acétone), on obtient un nombre de pigments différent. Nous avons déjà signalé que le traitement des pigments à l'acétate de plomb entraîne une hydrolyse partielle des anthocyanes acylés ce qui a pour effet d'en diminuer le nombre; d'autre part, les manipulations successives (évaporations et concentrations répétées) contribuent à simplifier les anthocyanosides eux-mêmes; c'est la raison pour laquelle nous avons rencontré dans ces extraits trois pigments supplémentaires non acylés, les pigments C I, C II et C IV.



RUTINOSE

(L rhamnosyl α 1 — 6 D glucose)

- S I : R_1 = glucose
 R_2 = H
- S II : R_1 = rutinose
- S III : R_1 = rhamnoglucose
 R_2 = H
 ou
 R_1 = diglucose
 R_2 = rhamnose

SCHEMA 3 : PIGMENTS DES PLANTULES DE SEIGLE

En fait, l'analyse chromatographique (solvant D) d'un extrait obtenu par la méthode à l'acétone fait apparaître 6 pigments dont deux relativement abondants : C III et C IX. L'un des pigments $R_f = 0,55$ (solvant D) est visible sur les chromatogrammes, mais s'y trouve en trop faible quantité pour l'isoler. Les pigments non acylés C I, C II et C IV ont été étudiés les premiers pour préciser la structure des pigments plus complexes qui dérivent de C I.

- Pigment C I

Les caractéristiques chromatographiques et spectrales de ce pigment sont les mêmes que celles du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside décrit par HARBORNE (45). (Schéma 4).

L'analyse de l'aglycone et des sucres de C I indique 3 molécules de glucose pour une molécule de cyanidol (Tableau VIII) confirmant ainsi sa nature trioside. Le rapport des extinctions $\frac{E_{440\text{ m}\mu}}{E_{\text{Max.Vis.}}}$ permet d'établir la structure 3 - 5 diglycoside de ce pigment. La fluorescence rose qu'il manifeste en U.V. et en milieu acide apporte une preuve complémentaire à l'identification de cette structure.

Par hydrolyse acide contrôlée, on obtient en outre 5 pigments fragmentaires qui ont été identifiés respectivement par chromatographie sur Whatman 1 dans le solvant D aux :

- cyanidol 3 sophoroside.
- cyanidol 3 - 5 diglucoside.
- cyanidol 3 glucoside.
- cyanidol 5 glucoside.
- cyanidol.

L'oxydation permanganique de C I par coupure sélective du groupement 3 glycosidique permet d'identifier le diholoside résultant, au sucre obtenu par oxydation identique d'un échantillon de sophoraflavonoloside (kaempférol 3 sophoroside).

Le comportement chromatographique des 2 sucres dans les solvants J et K (Tableau VII_a) est le même. De plus, les colorations jaune orangé à la diphénylamine-p, anisidine et brune à la diphénylamine-aniline (réactifs de BAILEY (62)) sont caractéristiques du sophorose (liaison I $\longrightarrow$ 2).

REMARQUE :

Le kaempférol 3 sophoroside a été isolé par extraction de 3 kgs de fruits de *Sophora japonica* selon la méthode de RABATE et coll. (65) que nous avons modifiée. Pour éliminer le saccharose très abondant dans ces extraits, nous avons remplacé le traitement par fermentation à la levure de bière par une chromatographie sur colonne de polyamide (hauteur : 26 cm; diamètre : 5 cm, 200 gr polyamide Woelm).

Les sucres, saccharose, glucose et fructose sont rapidement entraînés par élution avec CH_3COOH 15 %. Ce procédé permet de séparer aisément le sophoraflavonoloside de la rutine moins mobile. La purification du kaempférol 3 sophoroside est obtenue par recristallisation dans le mélange $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ -eau (1 : 1) v/v. (P.F. (anhydre) 206°C).

- Pigment C II

Le pigment C II contient du cyanidol et du glucose dans la proportion 1 : 2. Son comportement spectral indique que l'on a affaire à un 3 - 5 diglycoside (Tableau IX). La présence de cyanidol 3 glucoside et de cyanidol 5 glucoside parmi les pigments d'hydrolyse partielle confirme la structure 3 - 5 diglycoside de ce pigment. Les caractéristiques chromatographiques de ce dernier dans plusieurs solvants sont les mêmes que celles décrites dans la littérature (36).

- Pigment C IV

L'hydrolyse complète de ce pigment fournit du cyanidol et du glucose. Par coupure permanganique ou à H_2O_2 , on obtient du sophorose, ce qui l'identifie au cyanidol 3 sophoroside dont il a exactement les mêmes caractéristiques chromatographiques (Schéma 4).

- Pigment C I₂

La saponification des fonctions esters des pigments anthocyaniques contenus dans les extraits de chou rouge fournit essentiellement du pigment C I que l'on identifie après purification sur couches épaisses de cellulose (solvant J) au cyanidol 5 glucoside 3 sophoroside.

Le pigment C I obtenu par traitement alcalin de l'ensemble des pigments du chou rouge a les mêmes caractéristiques chromatographiques et spectrales que le pigment C I obtenu par précipitation à l'acétate de plomb.

Par la méthode à l'acétone, nous obtenons dans l'extrait de chou, à côté du pigment C I, un autre pigment que nous appelons C I₂ de caractéristiques chromatographiques très voisines.

C I et C I₂ peuvent être difficilement séparés avec des solvants acides sur papier Whatman I (solvant acide acétique - acide chlorhydrique - eau 3 : 1 : 8 v/v) et sur couches minces de cellulose (solvant K). Avec le solvant J sur couches minces de cellulose, les deux pigments ne sont pas séparés et forment une tache très allongée, C I₂ étant le plus mobile (Tableau V). Par traitement avec NaOH 10 %, pendant 2 heures, à température ambiante et sous azote, le mélange des pigments C I + C I₂ est transformé exclusivement en pigment C I ce qui est en faveur d'une structure acylée. Cependant, les spectres d'absorption des pigments C I et C I₂ sont identiques (Tableau XVII). Nous n'avons pas pu préciser la nature de la molécule ("co-pigment") associée à C I₂.

c) Pigments acylés du chou :

- Pigment C III

C III est le pigment le plus abondant dans les feuilles de chou rouge à maturité. Par saponification avec Na OH 10 %, on obtient du pigment C I et de l'acide férulique. Le dosage spectrophotométrique de l'acide permet d'attribuer au pigment C III deux molécules d'acide férulique par molécule de cyanidol (schéma 4).

Il n'a pas été possible par spectrographie I.R. de mettre en évidence une bande ν_{CH} (hors du plan) dans la région 970 cm^{-1} qui nous aurait permis d'affirmer la nature trans du groupement acylé.

Il est vraisemblable cependant que ce dernier existe sous cette forme.

Si l'on soumet le pigment à une saponification ménagée dans l'acétone en présence de K OH 0,3 N, on obtient essentiellement l'acide trans. D'après les résultats de la méthylation et de l'hydrolyse acétique de C III, l'acide férulique estérifie les positions 6 des deux molécules de glucose du groupement sophorose. Ce résultat est en accord avec l'oxydation périodique du pigment. La coupure périodique de ce dernier fournit en effet du glycérol.

- Pigment C VIII

L'hydrolyse acétique du pigment C III dans CH_3COOH 10 % à 95°C conduit au pigment C VIII acylé.

La saponification avec Na OH 10 % transforme ce dernier en pigment C IV. D'après le dosage spectrophotométrique, il contient deux molécules d'acide férulique. Compte tenu de sa parenté étroite avec C III, il est normal de lui attribuer le même groupement acylé fixé en 3 sur l'aglycone.

- Pigment C IX

L'hydrolyse alcaline de C IX permet de montrer que ce pigment est un dérivé acylé de C I. Il contient deux molécules d'acide férulique par molécule de cyanidol (Tableau XVII).

- Pigment C V

C'est l'un des pigments les moins abondants du chou rouge. L'hydrolyse alcaline avec Na OH 10 % le transforme en pigment C I et en acide férulique. Le dosage de ce dernier par la méthode habituelle permet de conclure à la présence d'une molécule d'acide férulique par molécule de cyanidol. Nous n'avons pas pu étudier de façon plus approfondie ce pigment isolé en trop faible quantité.

- Pigment C VI

On obtient par saponification de C VI du pigment C I et de l'acide p.coumari-

que, L'acide s'y rencontre dans la proportion de 1 mole d'acide p.coumarique pour 1 mole de cyanidol. L'hydrolyse acide contrôlée dans le méthanol-dioxane 0,5 % ClH s'effectue avec formation du pigment acylé C VII ($R_f = 0,98$ solvant D) dont la saponification conduit au pigment C IV. Il est donc vraisemblable que le groupement acyle est fixé sur le groupement sophorose en 3 comme c'est le cas pour les pigments C III, C VIII et C IX.

Ci-dessous, nous avons récapitulé les résultats de notre étude sur l'identification des pigments du chou.

<u>Pigment</u>	<u>Identification</u>
C I	cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside.
C 1 ₂	cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside + " co-pigment ".
C III	cyanidol 5 glucosido 3 (féruiloyle 6 glucosyle) 1 $\rightarrow$ 2 (féruiloyle 6 - glucoside)
C VIII	cyanidol 3 (féruiloyle 6 glucosyle) 1 $\rightarrow$ 2 (féruiloyle 6 glucoside).
C IX	cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside + 2 férulique.
C V	cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside + 1 férulique.
C VI	cyanidol 5 glucosido 3 (p.coumaroyl sophoroside).
C VII	cyanidol 3 sophoroside + 1 p.coumarique.

CHAPITRE IV

OBSERVATIONS SUR L'HYDROLYSE ALCALINE DES GROUPEMENTS ESTERS

a) Saponification

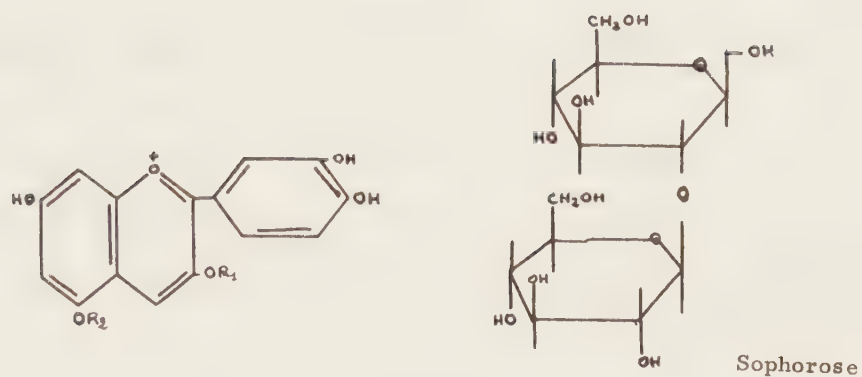
Lorsqu'on soumet les pigments du chou non purifiés à la saponification avec Na OH 10 %, sous azote, dans les conditions définies précédemment, il y a formation des acides p.coumarique, férulique, sinapique et d'un acide X que nous n'avons pas identifié. On n'observe pas la formation de cet acide lorsque la saponification est conduite sous azote dans l'acétone en présence de K OH 0,3N.

La saponification est complète au bout de 6 heures; nous l'avons poursuivie pendant 30 heures sans qu'il y ait formation d'acide X. Il est donc probable que la formation de cette substance est liée à la dégradation des acides hydroxycinnamiques en cours de saponification.

b) Origine de l'acide X

Pour vérifier l'hypothèse précédente, nous avons traité respectivement :

- 5 mg d'acide sinapique.



C I : R_1 = Sophorose

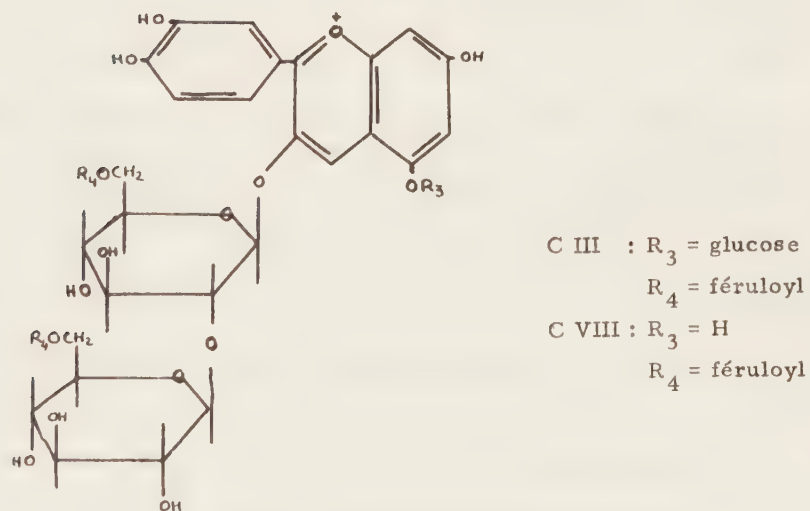
R_2 = glucose

C II : R_1 = glucose

R_2 = glucose

C IV : R_1 = sophorose

R_2 = H



SCHEMA 4 : PIGMENTS DU CHOU ROUGE

- 5 mg d'acide férulique.

- 5 mg d'acide p.coumarique.

avec 5 ml de Na OH 10 % à température ambiante sous azote et pendant 3 heures. Après réaction, on récupère les acides par traitement habituel à l'acétate d'isopropyle à pH 1.

Les 3 extraits sont ensuite analysés par chromatographie sur couches minces de cellulose (solvant J) suivie de révélation à la p.nitraniline diazotée.

Le chromatogramme des extraits p.coumarique et férulique est inchangé; il n'y paraît que les taches caractéristiques des acides sous les formes trans et cis. Le chromatogramme de l'extrait sinapique contient, en plus des deux taches trans et cis de cet acide, une troisième tache colorée en bleu de $R_f = 0,74$, caractéristique de l'acide X.

On peut donc affirmer que l'acide X est bien un produit de dégradation de l'acide sinapique.

Pour savoir lequel des deux stéréoisomères participe à la réaction, nous avons procédé aux essais suivants :

- 1 mg d'acide sinapique trans en solution dans 30 ml de CH_3OH est irradié pendant 1 heure sous azote à l'aide d'une lampe Philips (HPW 125) dépourvue de son enveloppe. On obtient ainsi en solution un mélange des deux stéréoisomères de l'acide sinapique. On évapore le solvant et le résidu sec est mis en solution dans 0,3 ml de Na OH 10 % (pH > 10) pendant 2 heures sous azote et à l'obscurité.

- on traite également comme dans l'essai précédent, 1 mg d'acide sinapique trans avec 0,3 ml de Na OH 10 % pendant 2 heures. Les acides sont ensuite régénérés à pH = 1 par la méthode habituelle. L'analyse chromatographique des extraits sur couche mince de polyamide (solvant CH_3COOH 30 %) montre avec netteté une formation plus importante d'acide X à partir du mélange acide sinapique cis + trans qu'à partir de l'acide sinapique trans.

L'acide X provient donc principalement de la dégradation de l'acide sinapique cis.

c) Isolement de l'acide X

0,4 g d'acide sinapique trans en solution dans 200 ml de méthanol sont irradiés sous hydrogène à l'aide d'une lampe Philips HPW 125 (dépourvue de son enveloppe). L'ensemble est immergé dans un bain thermostaté maintenu à 15° C.

La transformation de l'acide sinapique trans en acide cis est suivie à la fois par chromatographie sur couches minces de cellulose (solvant J) et par spectrographie d'absorption dans l'U.V. La réaction est très rapide et l'équilibre cis trans est pratiquement atteint en moins d'une heure. Après 1 heure d'irradiation, le mélange réactionnel contient environ 70 % de l'acide sinapique sous la forme cis. Cette solution est ensuite

évaporée à sec sous vide pour éliminer l'alcool méthylique. Le résidu est mis en solution dans 150 ml. de $\text{C}_3\text{H}_7\text{Na} \frac{\text{M}}{5}$ ($\text{pH} = 8,3$) puis maintenu pendant 3 heures à 60°C sous atmosphère d' H_2 . La solution prend une teinte orangée caractéristique; son spectre d'absorption présente un épaulement très net à $370 \text{ m}\mu$ ($E = 0,1$) à côté du maximum de l'acide sinapique ($300 \text{ m}\mu$ $E = 0,65$).

Par traitement du milieu réactionnel à $\text{pH} 1$ avec ClH conc. les acides sont régénérés puis extraits à l'acétate d'isopropyle par la méthode habituelle. L'analyse chromatographique de l'extrait sur couche mince de cellulose montre la présence des 3 acides : sinapique trans, sinapique cis et acide X. Ils sont facilement identifiés d'après les R_f ainsi que par leur fluorescence caractéristique en U.V. On procède à leur isolement par chromatographie sur couches épaisses de cellulose avec le solvant J.

On élue l'acide X à l'acétate d'isopropyle et concentre la solution par évaporation sous vide. Le résidu sec (12 mg) est repris avec 10 ml d'éther anhydre. Le spectre d'absorption dans l'éther éthylique est représenté Fig. 12 en même temps que celui de la scopoletine (6 methoxy 7 hydroxy coumarine). Ce spectre de l'acide X est différent de celui des coumarines dans l'U.V. moyen.

La solution d'acide X dans l'éther anhydre abandonne, après évaporation à sec, un résidu blanc amorphe qui ne se redissout que partiellement dans le méthanol. Différents essais de recristallisation dans ce solvant et dans le mélange éther éthylique méthanol ne nous a pas permis d'obtenir de cristaux.

L'analyse chromatographique sur couche mince de cellulose (solvant J) des extraits précédents, en fin d'élution et 24 heures plus tard met en évidence la disparition rapide de l'acide X au profit d'une substance qui ne migre pas. Au bout de quelques jours, la transformation est complète; il n'y a plus trace d'acide X sur les chromatogrammes.

La substance blanche amorphe, (vraisemblablement polymérisée) est soluble dans CCl_4 ; le spectre I.R. de la solution (Fig. 13) comparé à celui de l'acide sinapique trans est caractérisé par un accroissement important de l'intensité des bandes de vibration des CH ($2960, 2935, 2875, 2860 \text{ cm}^{-1}$) et par la présence de la bande de vibration des $>\text{C}=\text{O}$ à 1735 cm^{-1} . Par rapport au " massif " des CH, la bande $>\text{C}=\text{O} = 1735 \text{ cm}^{-1}$ est relativement moins intense que celle de l'acide; ce fait peut être interprété comme étant la conséquence d'une décarboxylation partielle de l'acide. On rencontre cette dernière à 1685 cm^{-1} dans le spectre de l'acide.

On note encore dans le spectre du polymère l'absence de la bande de vibration $(\text{C}=\text{C}) = 1660 \text{ cm}^{-1}$ de l'acide, ce qui indique un caractère plus saturé justifiant l'augmentation d'intensité du massif des CH.

La fréquence 1735 cm^{-1} est caractéristique d'un ester aromatique ou d'une δ lactone.

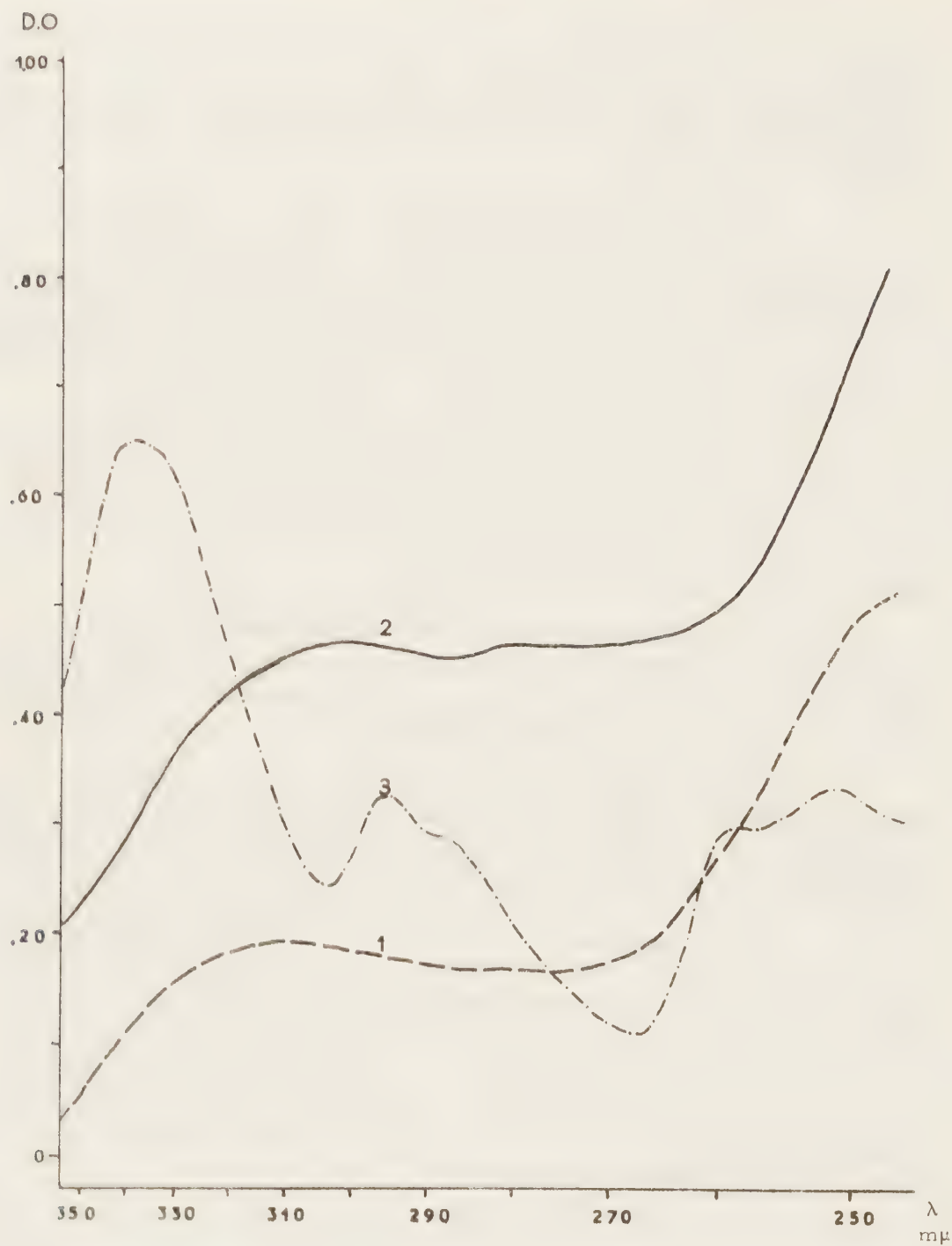


FIG. 12 : 1. Acide X en solution dans l'éther éthylique
 2. Acide X en solution dans CH₃OH
 3. Scopoletine en solution dans l'éther éthylique

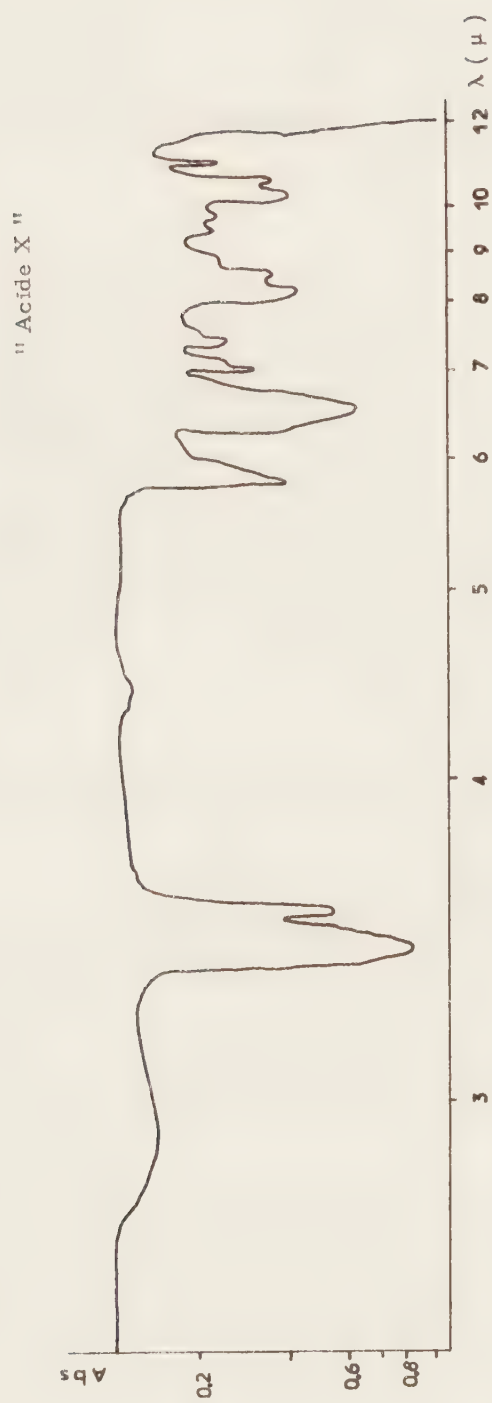


FIGURE 13

Il est donc probable que le polymère précédent est du type polystyrène; on peut admettre dans sa structure des groupements CO_2H estérifiant des fonctions phénols comme dans les depsides.

REMARQUE :

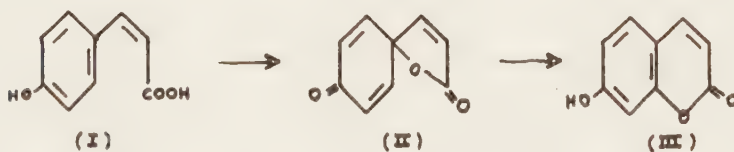
Nous n'avons pas encore pu faire l'analyse élémentaire de cette substance, ce qui renseignerait sur l'importance de la décarboxylation.

d) Nature de l'acide X

Il est difficile, d'après les observations précédentes, de préciser la nature de l'acide X.

Les coumarines sont parmi les substances les mieux connues qui dérivent d'une transformation simple des acides cinnamiques. BUTLER et SIEGELMAN (86) puis VAN SUMERE et coll. (87) ont signalé en même temps la transformation de l'acide caféique cis en esculétine par un processus d'autoxydation suivi de lactonisation. D'après MEYERS (88), la cyclisation oxydative de l'acide p.hydroxycinnamique cis (I) en spirodiénone (II) intermédiaire serait suivie d'une hydrolyse avec formation d'ombelliférone III. (Schéma 5). Rappelons que dans les plantes supérieures, les coumarines proviennent de la cyclisation des acides cinnamiques avec leur structure propre (89).

Schéma 5



Dans le cas de l'acide X, l'hypothèse de la formation d'une coumarine est à écarter; nous pensons qu'il s'agit en fait d'un acide. L'acide X comme l'acide sinapique n'est libéré de sa combinaison saline qu'à pH 2-3. C'est la raison pour laquelle nous ne rejetons pas à priori comme interprétation la formation d'un acide du type diphenyl cyclobutane mono ou dicarboxylique (IV) par condensation (et décarboxylation) de deux molécules d'acide sinapique.



Pour confirmer la remarque que nous avons faite au sujet d'une décarboxylation éventuelle de l'acide sinapique, il est utile de signaler que COHEN et JONES (90) ont montré que l'acide p.coumarique était facilement décarboxylé en milieu alcalin à pH 8,5 et en milieu acide à pH ≈ 2 avec formation de polymères correspondant au p.hydroxystyrène.

Notons aussi qu'il existe, chez certains microorganismes, (Aerobacter, aerogènes) des enzymes capables de décarboxyler les acides hydroxycinnamiques en hydroxystyrènes correspondants (91).

CHAPITRE V

SPECTRE INFRA-ROUGE DE PIGMENTS ISOLES DU SEIGLE ET DU CHOU

En dehors du travail fondamental de RIBEREAU-GAYON et JOSIEN (92), l'étude des pigments anthocyaniques par spectrographie I.R. n'a donné lieu qu'à un nombre limité de publications (93), (94), (95), (96).

Bien que le spectre de ces hétérosides soit complexe, nous avons essayé de dégager quelques caractéristiques communes, à quelques-uns des pigments anthocyaniques isolés au cours de notre travail.

Les spectres ont été examinés dans la région $3600 - 700 \text{ cm}^{-1}$ à l'aide d'un spectrographe Perkin-Elmer 221, à optique de Cl Na.

Les pigments ont été dispersés dans du Br K et étudiés sous forme de pastilles selon les indications données par RIBEREAU-GAYON et JOSIEN (92).

- Après lyophilisation et dessiccation pendant une nuit sur P_2O_5 , les pigments sont mélangés à du Br K dans la proportion de 3 à 5 % et broyés au mortier d'agate jusqu'à obtention d'une poudre rose pâle très fine.

On prélève 0,260 g de ce mélange et on le soumet à une pression de 12 t/cm^2 pendant 2 mn pour obtenir une pastille rouge rubis parfaitement transparente (diamètre = 13 mm).

1) Spectre I.R. des anthocyanosides

Nous avons choisi 4 pigments dont les structures sont différentes :

- cyanidol 3 glucoside.
- cyanidol 3 rhamnoglucoside.
- cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside.
- malvidol 3-5 diglucoside.

Les trois premiers ont été isolés des plantules de seigle et du chou rouge; le troisième est un échantillon commercial de malvine Fluka que nous avons purifié par chromatographie sur couches épaisses de cellulose (solvant : butanol-acide acétique-eau 4 : 1 : 2,2 v/v).

Les spectres de ces pigments ont en commun la bande 1637 cm^{-1} qui, d'après RIBEREAU-GAYON et JOSIEN (92) peut être attribuée à la double liaison de l'hétérocycle, conjuguée avec le noyau aromatique A.

Nous avons rencontré dans les hétérosides du cyanidol une bande typique à $1405\text{-}1410 \text{ cm}^{-1}$; cette bande est absente des spectres du malvidol 3-5 diglucoside et du cyanidol. On pourrait penser qu'elle est typique des formes cyanidol glycoside 3 et 3-5 diglycoside. En fait, lorsqu'on détruit la structure sel de flavylum par photolyse (travail en préparation), les bandes 1637 cm^{-1} et 1405 cm^{-1} se retrouvent dans les spectres des produits de transformation. Par ailleurs, la bande 1405 cm^{-1} apparaît aussi dans le spectre du produit de transformation par photolyse du malvidol 3-5 diglucoside.

Dans la région $1400\text{-}1420 \text{ cm}^{-1}$, on rencontre les bandes de déplacement des CH du groupement $\text{-}\underset{\text{I}}{\text{C}}=\text{CH-}$: ceci est une simple observation et il ne peut être question d'identification pour le moment.

En outre, RIBEREAU-GAYON et JOSIEN (92) signalent l'absence de la bande caractéristique du glucose à 1150 cm^{-1} dans les hétérosides simples (cyanidol et malvidol 3-5 diglucosides); nous confirmons cette observation qui s'applique aussi aux pigments que nous avons étudiés.

2) Pigments anthocyaniques acylés

L'introduction de fonctions esters dans l'édifice anthocyanoside provoque une modification de la région $1680\text{-}1720 \text{ cm}^{-1}$ avec apparition d'une bande caractéristique du groupement carbonyle. La bande $\text{>C=O} = 1705 \text{ cm}^{-1}$ des pigments C III, et C IX peut être attribuée au groupement ester non saturé : $\text{-C=C-C} \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \text{O} \end{smallmatrix}$.

Ces observations sont en nombre trop limité pour tirer des conclusions; cependant, il n'est pas déplacé de dire que la spectrographie I.R. peut apporter d'autres informations structurales bien qu'elle n'ait pas la sensibilité de la spectrographie d'absorption dans l'U.V.

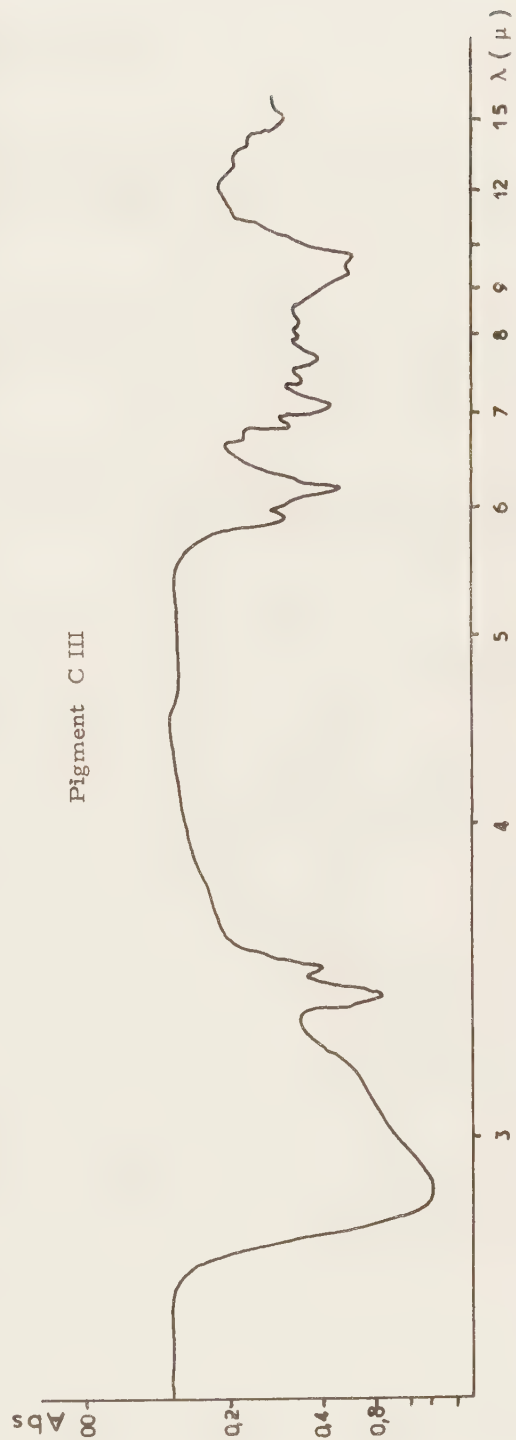


FIG. 14 : SPECTRES I. R. DES PIGMENTS DU CHOU ROUGE : C I et C III

CHAPITRE VI

ETUDE DE LA SEPARATION DES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES PAR ELECTROPHORESE

Cette étude n'a qu'un caractère comparatif : nous avons essayé d'établir quelques observations entre les vitesses de migration relatives des pigments et leur structure. La méthode de séparation des pigments anthocyaniques par électrophorèse n'est pas encore appliquée de façon systématique.

Les sels de flavylum en solution dans un milieu de pH 2 se comportent comme de véritables cations (97), (98); lorsqu'ils sont soumis à l'action d'un champ électrique, ils se déplacent vers la cathode.

Nous avons établi les vitesses de migration relatives des pigments isolés du seigle et du chou par électrophorèse sur couches minces de cellulose (20/20 cm).

L'appareillage et la technique ont été décrits dans la 1ère Partie; en voici les conditions d'application aux pigments anthocyaniques :

- tension 2000 V.
- intensité 20 mA.
- durée de l'opération : 1 h.30.
- température de la platine : 3° C.
- électrolyte : acide formique 0,1 N (100 ml) saturé de n-butanol (9 ml)
pH 2,3.

Mode opératoire :

Sur une même chromatoplaque, on dépose l'un à côté de l'autre sous forme de traînées de 1,5 cm de long le pigment, un échantillon de dextrane et un échantillon témoin cyanidol 3 glucoside; chaque dépôt est de 50 μ l. Le déplacement du dextrane permet d'établir la correction d'électroendosmose et de connaître la distance parcourue réellement par les pigments sous l'effet du champ électrique.

Dès la fin de l'électrophorèse, la chromatoplaque est retirée de la platine, puis on la met à sécher à plat ce qui limite la diffusion des traînées. On détermine les distances parcourues par les pigments et les témoins par enregistrement photodensitométrique ce qui augmente la précision des mesures.

Etant donné la structure granulaire du support, il n'est pas possible d'apprécier directement le parcours réel des particules et de traduire les résultats en mobilités absolues. C'est la raison pour laquelle nous avons exprimé les résultats en mobilités apparentes relatives par rapport au cyanidol 3 glucoside choisi comme témoin.

D'après les résultats rassemblés dans le Tableau XIX, nous voyons d'une manière générale que les pigments de plus grande mobilité en électrophorèse ont les R_f les plus bas en chromatographie : solvant A.

Les mobilités électrophorétiques des pigments simples croissent quand le nombre de molécules de sucres augmente : le cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside a la mobilité la plus élevée de la série.

La disposition des molécules de sucre sur l'aglycone semble jouer un rôle important comme en chromatographie : ainsi le cyanidol 3 sophoroside et le cyanidol 3-5 diglucoside ont des mobilités très différentes.

Le remplacement d'un élément glucose par un élément rhamnose contribue à diminuer la mobilité : ainsi le cyanidol 3 sophoroside et le cyanidol 3 rhamnoglucoside ont des mobilités très différentes tandis que leur comportement chromatographique (solvant A) est voisin.

Il faut être cependant prudent dans l'établissement de ces relations; faute d'un plus grand nombre d'indications, il est difficile d'apprécier l'influence de la nature des liaisons sucre-sucre sur la mobilité des pigments.

Le phénomène de migration électrophorétique est complexe; nous n'avons pas suffisamment de résultats pour faire ici une étude critique des différents facteurs d'ordre structural qui peuvent modifier la vitesse de déplacement des particules sur support de cellulose.

Cependant, l'intérêt de la technique en tant que méthode d'analyse des pigments anthocyaniques est indéniable; à titre d'exemple, le rapport des mobilités apparentes relatives des pigments C IV et S II est de 2,23. MARKAKIS (97) a séparé par électrophorèse sur papier la médocyanine (cyanidol 3 sophoroside) et l'anthirrhinine (cyanidol 3 rhamnoglucoside); d'après ses indications, le rapport des mobilités de ces deux pigments est de 2,31 : les 2 résultats sont concordants et confirment les possibilités de la méthode électrophorétique sur cellulose.

Pigment		Mobilités relatives apparentes M_{G_a}	R_f dans solvant A
S_I	(cyanidol 3 glucoside)	1,00	0,39
S_{II}	(cyanidol 3 rhamnoglucoside)	1,93	0,38
S_{III}	(cyanidol 3 rhamnodiglucoside ou 7 rhamnosido 3 diglucoside)	3,13	0,22
C_I	(cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside)	4,61	0,17
C_{I2}	(cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside + " co-pigment ")	4,84	"
C_{II}	(cyanidol 3-5 diglucoside)	2,36	0,27
C_{IV}	(cyanidol 3. sophoroside)	4,32	0,32
C_{III}	(C_I + férulique)	4,03	0,20

M_{G_a} : Mobilités exprimées par rapport au déplacement de S_I choisi comme témoin.

TABLEAU XIX

MOBILITES APPARENTES DE QUELQUES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

IIème PARTIE

- 1 Karrer P. et Strong F.M., *Helv.Chim.Acta* (1936) 19, 25.
- 2 Karrer P. et Weber H.M., *Helv.Chim. Acta* (1936) 19, 1025.
- 3 Kuhn R. et Lederer E., *Ber.dtsch.Chem.Ges.*(1931) 64, 1349.
- 4 Li K.C. et Wagenknecht A.C., *J.Amer.Chem.Soc.*(1956) 78, 979.
- 5 Spaeth E.C. et Rosenblatt D.H., *Anal.Chem.* (1950) 22, 1321.
- 6 Forsyth W.G. et Quesnel V.C., *Biochem.J.* (1957) 65, 177.
- 7 Endo T., *Nature* (1958), 182, 801.
- 8 Chandler B.V. et Harper K.A., *Nature* (1958) 181.
- 9 Stroh H.H., *Z.Naturforschg* (1959) 14 b, 699.
- 10 Garber E.D., Redding W.F. et Chorner W., *Nature* (1962) 193, 801.
- 11 Chandler B.V. et Swain T., *Nature* (1959) 183, 989.
- 12 Roach W.H., *Ann.Botany London* (1958) 22, 127.
- 13 Ice C.H. et Wender S.H., *Anal.Chem.* (1952) 24, 1616.
- 14 Birkofer L., Kaiser C. et Donike M., *J.Chromatog.* (1966) 22, 303.
- 15 Bate-Smith E.C., *Nature* (1948) 161, 835.
- 16 Bate-Smith E.C., *Biochem.Soc.Symposia* (1949) N° 3, 62.
- 17 Nordström C.G. et Swain T., *Arch. Biochem.Biophys.* (1956) 60, 329.
- 18 Nordström C.G., *Acta Chem. Scand.* (1956) 10, 1491.
- 19 Harborne J.B., *J.Chromatog.* (1958) 1, 473.
- 20 Abe Y. et Hayashi K., *Bot.Mag. Tokyo* (1956) 69, 822.
- 21 Bate-Smith E.C. et Westall R.G. *Biochim. Biophys.Acta* (1950) 4, 427.
- 22 Reichl E.R., *Mon.Chem.* (1955) 86; 69.
- 23 Stahl E. et Schorn P.J., *Z. Physiol. Chem.Hoppe Seyler's* (1961) 325, 263.
- 24 Birkofer L., Kaiser C. et Meyer-Stoll H., *Z.Naturforschg.* (1962) 17 b, 352.
- 25 Hess D. et Meyer C., *Z.Naturforschg.* (1962) 17 b, 853.
- 26 Paris R. et Paris M., *Bull.Soc.Chim.* (1963) 8, 1597.
- 27 Partridge S.M., *Biochem.J.* (1948) 42, 238.
- 28 Bate-Smith E.C. - *Biochem. J.* (1954) 58, 122.
- 29 Asen S., *J.Chromatog.* (1965) 18, 602.
- 30 Paris R. et Faugeras G., *Ann.Pharm.Franç.* (1955) 13, 359.
- 31 Paris R., *Pharmaceutica Acta Helvetiae* (1960) 18, 29.
- 32 Reznik H., *Planta* (1957) 49, 406.
- 33 Wyler H. et Dreiding A.S., *Helv.Chim.Acta* (1957) 40, 191.
- 34 Bayer E., *Chem.Ber.* (1959) 92, 1062.
- 35 Markakis P., *Nature* (1960) 187, 1092.
- 36 Harborne J.B., *J.Chromatog.* (1958) 1, 473.
- 37 Ribéreau-Gayon P., *Thèse, Paris* (1959).
- 38 Willstätter R. et Bolton E.K., *Ann.* (1916), 412, 113.

- 39 Karrer P. et Widmer R., *Helv. Chim. Acta* (1927) 10, 67.
- 40 Kuroda C. et Wada M., *Bull. Chem. Soc. Japan* (1936) 11, 272.
- 41 Chmielewska I., *Roczn. Chem.* (1936) 16, 384.
- 42 Chmielewska I., *Roczn. Chem.* (1938) 18, 176
- 43 Geissman T.A. et Harborne J.B., *Arch. Biochem. Biophys.* (1955) 55, 447.
- 44 Harborne J.B., et Sherrat H.S., *Experientia* (1957) 13, 486.
- 45 Harborne J.B., *Phytochemistry* (1963), 2, 85.
- 46 Harborne J.B., *Phytochemistry* (1964) 3, 151.
- 47 Birkofer L., Kaiser C., Donike M. et Roch W., *Z. Naturforschg.* (1965) 20b, 424.
- 48 Seyffert W., *Z. F. Pflanzenzüchtg* (1960) 44, 4.
- 49 Birkofer L., Kaiser Ch. et Koch W., Donike M. et D. Wolf, *Z. Naturforschg.* (1963) 18 b, 631.
- 50 Partridge S.M., *Nature* (1949) 164, 443.
- 51 Neu R., *Naturwissenschaften* (1957) 44, 181.
- 52 Swain T., *Biochem. J.* (1952) 53, 200.
- 53 Barton G.M., Evans R.S. et Gardner J.A.F., *Nature* (1952) 170, 249.
- 54 Geissman A., Jorgensen E.C. et Harborne J.B., *Chem. and Ind.* (1953) 1389.
- 55 Bate-Smith E.C., *Biochem. J.* (1954) 58, 122.
- 56 Roux D.G., *Nature* (1957_b) 180, 973, *Nature* (1957_a) 179, 305.
- 57 Grisebach H., *Z. Naturforschg.* (1957) 12 B, 227.
- 58 Reio L., *J. Chromatog.* (1958) 1, 338.
- 59 Harborne J.B. et Sherrat H.P., *Biochem. J.* (1957) 65, 23 p.
- 60 Wood T., *Biochem. J.* (1956) 62, 611 - Kressman T.R.E. *Chem. and Ind.* (1956) 64.
- 61 Dedonder R., *Bull. Soc. Chim. France* (1952) 19, 874.
- 62 Bailey, J. *Chromatog.* (1962) 8, 57.
- 63 Gabriel O. et Igals D., *Biochem. and Biophys. Research Comm.* (1960) 2, 358.
- 64 Chandler B.V. et Harper K.A., *Austr. J. Chem.* (1961) 14, 586.
- 65 Rabaté J. et Dussy J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1938) XX, 459, *ibid.* (1938) XX, 467.
- 66 Harborne J.B. et Hall E., *Phytochemistry* (1964) 3, 453.
- 67 Leopold B., *Anal. Chem.* (1962) 34, 170.
- 68 Harborne J.B., *Biochem. J.* (1958) 70, 22.
- 69 Harborne J.B., *Nature* (1957) 429.
- 70 Metche M. et Urien E., *C.R. Acad. Sci.* (1961).
- 71 Karrer P., de Meuron G., *Helv. Chim. Acta* (1932) 15, 507 et 1212.
- 72 Birkofer L., Kaiser C., *Z. Naturforschg.* (1963) 18b, 337.
- 73 Albach R.F., Webb A.D. et Kepner R.E., *J. Food. Sci.* (1965) 30, 620.
- 74 Koeppen, B., Basson P., *Phytochemistry* (1966) 5, 183.
- 75 Harborne J.B., *Biochem. J.* (1960) 72, 262.
- 76 Ibrahim R.K., Towers G.H.N., *Archiv. Biochem. Biophys.* (1960) 87, 125.
- 77 Urien E., Metche M. et Halluck J.P., *Brauwissenschaft* (1963) n° 6, 211.
- 78 Pastuska G., *Z. Anal. Chem.* (1961) 179, 355.
- 79 Pastuska G., Trinks H., *Chem. Ztg.* (1961) 85, 535.
- 80 Van Sumere C.F., Wolf G., Teuchy H. et Kint J., *J. Chromatog.* (1965) 20, 48.
- 81 Reio L., *J. Chromatog.* (1960) 4, 458.

- 82 Geissman T.A., Jorgensen E.C. et Harborne J.B., Chem. and Indust. (1953) 1389.
83 Karrer P. et Widmer R., Helv. Chim. Acta (1928) 11, 837, *ibid.* (1929) 12, 292.
84 Petek F., Bull. Soc. Chim. (1965) 1, 263.
85 Harborne J.B. et Hall E., Phytochemistry (1964) 3, 453.
86 Butler N.L. et Siegelman A.W., Nature (1959) 183, 1813.
87 Van Sumere C.F., Parmentier F. et Van Poucke M., Naturwissenschaften (1959) 46, 668.
88 Meyers M.B., Proc. Chem. Soc. Lond. (1963) 243.
89 Pridham J.B., Annual Review of Plant Physiology (1965) 16, 13.
90 Cohen L.A. et Jones W.M., J. Amer. Chem. Soc. (1960) 82, 1907.
91 Finkle B.J., Lewis J.C., Corse J.W. et Lundin R.E., J. Biol. Chem. (1962) 237, 2926.
92 Ribéreau-Gayon P. et Josien M.L., Bull. Soc. Chim. France (1960) 934.
93 Li K.G. et Wagenknecht, J. Amer. Chem. Soc. (1956) 78, 979.
94 Forsyth W.G. et Quesnel V.C., Biochem. J. (1957) 65, 177.
95 Bendz G., Martensson O. et Meresius L., Acta Chem. Scand. (1962) 16, 1183.
96 Koeppen B. et Basson P., Phytochemistry (1966) 5, 183.
97 Markakis P., Nature (1960) 187, 1092.
98 Kuhn H. et Sperling W., Experientia (Basel) (1960) 16, 237.

IIIème PARTIEPREPARATION DES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES A PARTIR DES
FLAVONOLSCHAPITRE I GENERALITESCHAPITRE II ETUDE DE LA REDUCTION ELECTROLYTIQUE DU QUERCETOL 3
RHAMNOGLUCOSIDE SUR CATHODE DE MERCUREA. Appareillage, Dispositif d'électrolyse.

- a) Cellule de 250 ml.
- b) Cellule de 2,5 litres.

B. Préparation et isolement du cyanidol 3 rhamnoglucoside.

- a) Conditions de l'électrolyse.
- b) Mode opératoire.
- c) Isolement des produits de la réaction.
- d) Purification.

C. Etude de la réaction de réduction.

- a) Etude qualitative.
- b) Identification des pigments provenant du traitement des produits (I) et (II) à l'A.P.T.S. et à la D.C.Q.
 - 1) Action de l'A.P.T.S.
 - 2) Action de la D.C.Q.
 - 3) Action de l'O₂ de l'air.
- c) Dosages des produits de réduction (I) et (II) :
 - 1) Dosage des produits de réduction (I) et (II) à l'A.P.T.S. et à la D.C.Q.
 - 2) Rendement de la transformation rutine, pigment.
 - 3) Dosage du produit de réduction (II) par potentiométrie.

CHAPITRE III MECANISME DE LA TRANSFORMATION DE LA ROUTINE EN CYANIDOL
3 RHAMNOGLUCOSIDE

- a) Réduction.
- b) Oxydation de (II).

CHAPITRE IV REDUCTION ELECTROLYTIQUE DU CYANIDOL 3 RHAMNOGLUCOSIDE

IIIème PARTIE

PREPARATION DES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES A PARTIR DES FLAVONOLS

CHAPITRE I

GENERALITES

Les glycosides flavoniques d'origine naturelle connus et identifiés sont plus nombreux que les anthocyanosides correspondants. On retrouve dans leur structure les éléments essentiels constitutifs de ces derniers :

- aglycone ou génine.
- sucres.
- éventuellement, des groupements esters.

Les glycosides flavoniques offrent l'avantage de se prêter à des critères de purification communs à la plupart des combinaisons organiques; leur stabilité est en général bien meilleure que celle des anthocyanosides correspondants.

Leur parenté étroite avec les pigments anthocyaniques leur a valu plusieurs tentatives de transformations chimiques pour passer notamment de la forme flavonol à la structure sel de flavylum. Parallèlement, sur le plan biogénétique, cette parenté a été l'origine de recherches pour étudier in vivo chez les végétaux la transformation éventuelle des flavonols en pigments anthocyaniques.

Toutes ces réactions sont fondées sur la réduction du carbonyle avec formation d'intermédiaires qui traités en milieu acide sont transformés en sels de flavylum. WILLSTATTER et coll. (1) ont signalé les premiers la transformation du quercétol en cyanidol par réduction à l'aide de Magnésium en milieu hydro-alcoolique et acide. Le rendement de cette réaction en cyanidol est environ de 2 %: cette méthode ne saurait être d'un grand intérêt du seul point de vue préparatif. En fait, la formation de produits secondaires et en particulier l'obtention par MALKIN et NIERENSTEIN (2) de chlorure de quercétylène par réduction du quercétol dans l'anhydride acétique en présence de Zn. montre bien la complexité de la réduction des flavonols par les métaux.

A la suite des travaux de WATSON et coll. (3), ASAHINA et INUBUSE (4) ont obtenu de meilleurs résultats par réduction des flavonols et de leurs hétérosides en milieu méthanolique acide à l'aide d'amalgame de Na.

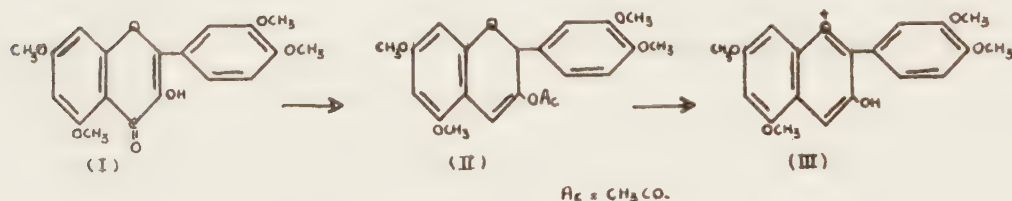
La réduction de la rutine (quercétol 3 rhamnoglucoside) conduit par ce procédé à

l'anthocyanoside correspondant avec un rendement de 43 %. Le mécanisme de cette réaction fait intervenir la formation intermédiaire d'une base carbinol qui en milieu acide se transforme en sel de flavylum correspondant.

De leur côté, KARRER et coll. (5) ont étudié la réduction par le $TiCl_3$ de plusieurs flavonols en milieu ammoniacal. L'utilisation de ce réactif présente un intérêt pour l'étude de ces transformations : signalons notamment la réduction réversible de l'oenoside (malvidol 3 glucoside) par RIBEREAU-GAYON et GARDRAT (6) à l'aide de ce réactif.

Reprenant les travaux de MIRZA et ROBINSON (7) sur la réduction du kaempférol en pélargonidol à l'aide de $LiAlH_4$, BAUER et BIRCH (8) ont décrit la transformation de la rutine décaacétylée au moyen de ce réducteur. Du traitement du produit de réduction par ClH dilué et à froid résulte le cyanidol 3 rutinoside avec un rendement de 29 %.

La méthode proposée par KING et WHITE (9) consiste à réduire les flavonols par chauffage à reflux dans l'anhydride acétique en présence de Zn . Cette réaction a été d'abord étudiée par LAUMAS et SESHADRI (10) puis récemment par SESHADRI et coll. (11): le 5-7-3'-4' tétraméthoxy quercétol (I) est réduit principalement en acétoxy 3 tétraméthoxy 5-7-3'-4' flavène 3-4 (II). Ce dernier est facilement transformé en tétraméthoxy 5-7-3'-4' cyanidol (III).



Cette méthode peut être appliquée aussi à la préparation des anthocyanosides à partir des flavonols glycosides. Par acétylation réductrice le quercétol et le kaempférol 3 rhamnoglucosides sont transformés en produits de réduction acétylés; ces derniers sont ensuite hydrolysés par traitement alcalin en atmosphère inerte puis traités par ClH à 2 % et à froid. Dans ces conditions, le rendement en cyanidol et pélargonidol 3 rhamnoglucosides est de 35 % environ.

Les deux dernières méthodes sont d'une application pratique intéressante; elles permettent d'obtenir des anthocyanosides avec des rendements acceptables. Il y a donc là un moyen simple pour préparer des pigments anthocyaniques de type nouveau substitués par des groupements glycosidiques complexes. Les groupements glycosidiques des flavonols offrent en effet une plus grande diversité que ceux des anthocyanosides. De nombreux flavonols pourraient être utilisés pour la préparation d'anthocyanosides complexes difficilement accessibles par voie de synthèse. La méthode présente cependant un inconvénient:

elle exige des quantités de flavonols de l'ordre de 0,2 à 0,5 gr. pour obtenir un rendement satisfaisant.

D'autre part, la méthode de SESHADRI nécessite certaines précautions pour empêcher l'hydrolyse des groupements glycosidiques.

Les progrès récents dans le domaine des pigments anthocyaniques et des flavonols acylés (12) montrent que ces deux catégories de flavonoides contiennent des éléments communs : sucres et acides; leur étude simultanée peut apporter des renseignements d'ordre structural sur les deux types de flavonoides. Néanmoins, la transformation des flavonols acylés en pigments anthocyaniques correspondants donne des résultats peu satisfaisants en utilisant les méthodes précédentes : la fragilité des fonctions esters s'accommode mal d'un traitement alcalin. Cet aspect du problème nous a décidés à rechercher une méthode de réduction plus simple et d'application générale.

Nous avons donc étudié la réduction électrolytique des flavonols en milieu aqueux faiblement acide. Outre l'avantage de la simplicité, la méthode proposée est bien adaptée à la réduction de petites quantités de l'ordre de 0,5 à 1 mg.

Elle permet d'obtenir des pigments anthocyaniques plus purs que par la méthode d'acétylation réductrice.

Notons qu'en 1938, BANCROFT et RUTZLER (13) ont signalé la transformation des " flavones et flavonols " en pigments anthocyaniques par réduction électrolytique. Ces auteurs ne donnent cependant aucune précision sur les conditions de la réaction et la nature exacte des produits de réduction obtenus.

Nous nous proposons d'étudier ici la transformation du quercétol 3 rhamnoglucoside en cyanidol 3 rhamnoglucoside par réduction électrolytique.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA REDUCTION ELECTROLYTIQUE DU QUERCETOL 3 RHAMNOGLUCOSIDE SUR CATHODE DE MERCURE

L'aspect le mieux connu de la réduction électrolytique est représenté par la polarographie qui utilise l'artifice de l'électrode à gouttes de mercure pour obtenir des courbes de polarisation nettes et reproductibles.

L'électrode à gouttes de mercure offre plusieurs avantages :

- le mercure présentant une forte surtension d'hydrogène, la décharge des ions H^+ risque peu de masquer la courbe de polarisation des substances à réduire.
- l'obtention de paliers de diffusion bien définis.

En contre partie, il est nécessaire d'opérer sur des solutions faiblement concentrées de l'ordre de $10^{-2}M$.

Lorsqu'il s'agit d'aborder la préparation par réduction électrolytique sur cathode de mercure de grande surface, les dispositions précédentes sont modifiées.

A densité de courant égale, une électrode de grande surface permet le passage de plus de courant et facilite la réduction d'une plus grande quantité de substance : c'est le but que nous recherchons dans cette transformation.

Outre cet avantage, il est encore possible d'obtenir des densités de courant élevées ce qui permet certaines réductions qui ne sont pas réalisables en polarographie.

Les conditions opératoires étant bien définies, la méthode donne d'excellents résultats..

A. Appareillage - Dispositif d'électrolyse .

Nous avons été amenés à utiliser deux types de cellules d'électrolyse de capacités différentes : 250 ml. , 2,5 l.

La première nous a servi à étudier la réaction ; nous avons utilisé la seconde pour préparer et isoler les produits de réduction.

a) Cellule de 250 ml.

La cellule est représentée Fig. 15_b. Elle est constituée par un ballon pyrexien en Pyrex de 250 ml. de capacité dont le fond est traversé par une tige de tungstène que nous y avons rapportée. Ce conducteur permet d'amener le courant à l'électrode de mercure qui occupe la partie inférieure du compartiment cathodique. L'électrode a une surface de 7 cm² environ pour un poids de mercure fraîchement distillé de 130 gr.

Un tube abducteur T permet d'y amener de l'azote (azote U de l'Air Liquide) soigneusement débarrassé des traces d'oxygène qu'il contient. La purification est obtenue par passage successif de l'azote dans un tube garni de tournure de cuivre chauffée à 700° C puis dans une suspension de $Mn(OH)_2$.

Le compartiment anodique est formé d'un tube cylindrique de 15 mm de diamètre intérieur fermé dans sa partie inférieure par un disque en verre fritté (Epaisseur 3 mm - Porosité n° 3) que nous y avons soudé. Un fil de platine de 0,5 mm de diamètre enroulé en spirale sert d'anode.

Pour éviter la diffusion d'O₂ vers le compartiment cathodique, ce dispositif est éventuellement complété par un tube fin en polyéthylène (t) qui permet d'amener de l'azote purifié au voisinage immédiat du diaphragme en verre fritté.

La substance à réduire en solution dans l'électrolyte occupe environ les 3/4 de la capacité du compartiment cathodique, tandis que le compartiment anodique est rempli seulement avec l'électrolyte.

Le dispositif d'électrolyse (Fig. 16) comprend la cellule précédente, une électrode de référence au calomel saturé de ClK de 7 cm² de surface, un générateur de courant continu stabilisé de 300 Watts dont la tension est réglable de 0 à 400 V et deux appareils de mesure pour définir tension et intensité.

b) Cellule de 2,5 l.

L'appareillage et le dispositif électrique sont semblables aux précédents (Fig. 15_a). La cellule d'électrolyse de dimensions plus grandes a une capacité de 2,5 l et permet d'opérer sur 2 litres de solution avec une électrode de mercure de 119 cm² de surface.

Elle est constituée par un réacteur cylindrique (SOVIREL) dont la partie supérieure est fermée par un couvercle amovible à bord plat muni de 5 ouvertures dont 3 seulement sont représentées sur la figure 15_b. L'ouverture centrale (diamètre = 3 cm) livre passage à un tube cylindrique fermé par une paroi en verre fritté de 5 cm de diamètre, le tout tenant lieu de compartiment anodique. Le tube de verre C garni de Hg plonge dans le mercure du compartiment cathodique; son extrémité est munie d'une pointe de tungstène qui assure le contact mercure-mercure.

Le réacteur cylindrique peut être immergé dans un bain à circulation d'eau froide pour maintenir le milieu réactionnel à température constante (20 °C).

Le dispositif électrique est le même que le précédent à la différence que le générateur de courant continu a une puissance de 1000 Watts, ce qui permet le passage d'un courant de plus forte intensité (300 mA).

B. Préparation et isolement du cyanidol 3 rhamnoglucoside.

a) Conditions de l'électrolyse

Dans la préparation de l'électrolyse, nous avons cherché à satisfaire les conditions suivantes :

- bonne conduction du courant électrique dans un solvant moins réductible que la substance étudiée.
- solubilité suffisante de la rutine.
- inertie du milieu vis à vis de la rutine et des produits de réduction.

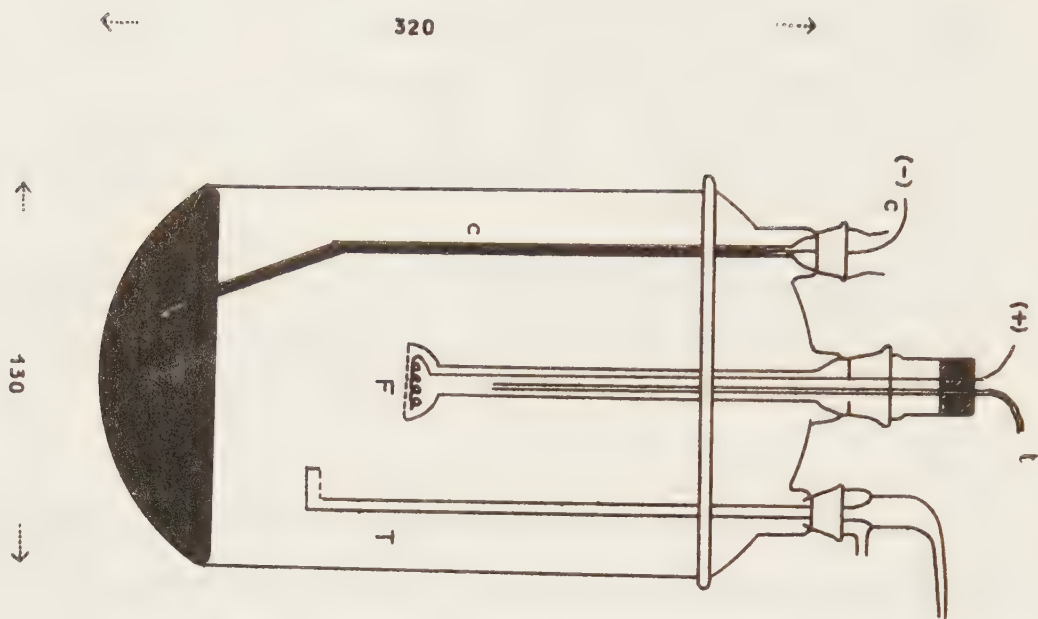


FIG. 15a

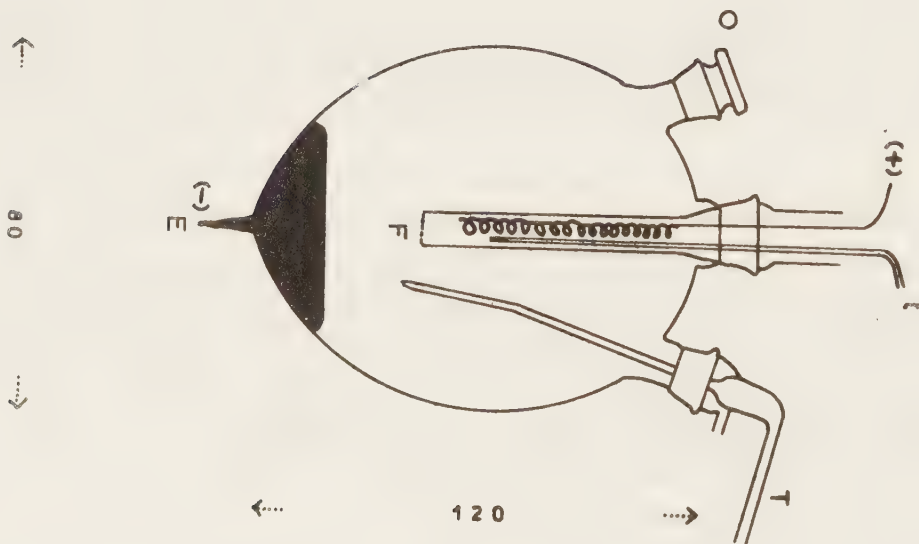
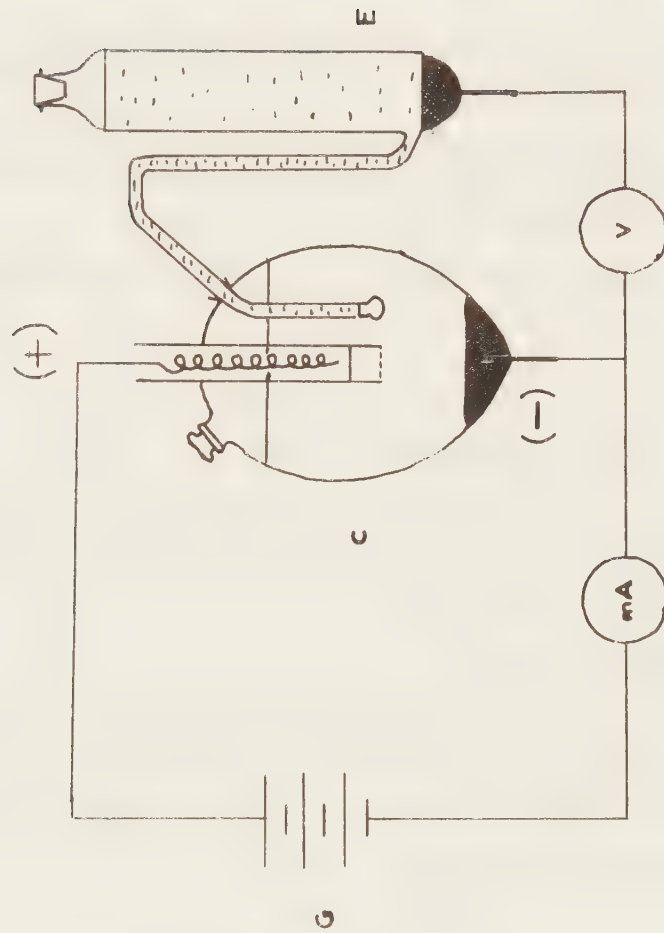


FIG. 15b

FIG. 16

La composition en est la suivante (solvant A) :

- SO_4H_2 2,5 % : 1 vol.
 - HCOOH 2 % : 1 vol.

Ce milieu acide ($\text{pH} = 2,15$) permet d'atteindre avec une cathode de mercure des potentiels de l'ordre de $-0,9$ V. avant décharge des ions H^+ . Ce potentiel est défini par rapport à l'électrode de référence au calomel saturé (potentiel = $+0,25$ V.). La solubilité de la rutine est très faible dans ces conditions (7 mg/100 ml) mais cela n'est pas gênant.

Cette concentration se prête bien à l'étude spectrophotométrique des solutions; de plus, il est possible d'obtenir des courbes de polarisation reproductibles.

Sur la Fig. 17, nous avons représenté la courbe de polarisation de la rutine (courbe A; $c = 7$ mg/100 ml) qui permet de préciser les conditions d'étude de la réduction $-0,94$ V., 23 mA, sous atmosphère inerte.

Nous avons également utilisé le solvant B plus acide que le précédent

($\text{pH} = 1$) :

HCOOH : 50
 Eau : 50
 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: 5 (v/v)

dans lequel la rutine est plus soluble (30 mg/100 ml).

Ce solvant a l'inconvénient de favoriser des réactions secondaires qui compliquent la réaction de réduction initiale. Nous en reparlerons brièvement au moment de l'étude du mécanisme de la réduction.

b) Mode opératoire.

Nous avons utilisé la cellule préparative décrite précédemment. On disperse 1 g. de rutine dans 2,5 l. de solvant A préalablement désaéré par passage d'azote; dans ces conditions, la solution est saturée en rutine qui s'y trouve à l'état de suspension.

Conditions de réduction :

$V = -0,94$ V.

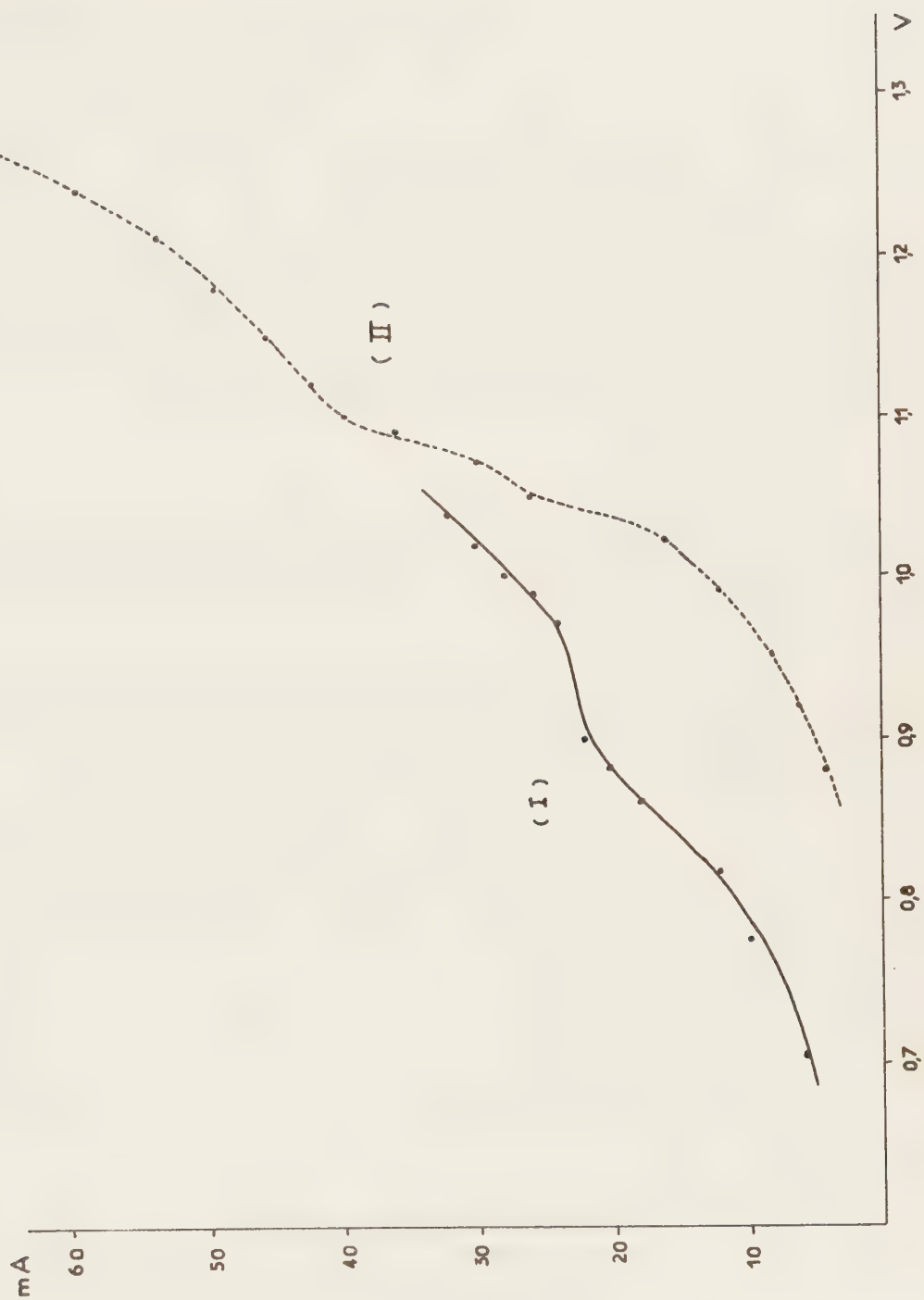
$I = 300$ mA.

Durée de la réaction : 30 heures.

Température du milieu réactionnel : 20°C .

La réduction est effectuée sous atmosphère inerte par passage d'azote dans le milieu réactionnel ce qui permet un brassage énergétique de la suspension sans avoir besoin d'autre agitation. Après 30 heures de réduction, le mélange est oxydé par agitation à l'air pendant 12 heures.

On élimine les acides résiduels avec de l'acétate de Ba à 10 % ou mieux

Fig. 17

encore, par traitement à la di n octyl-méthylamine (voir 2ème Partie). La solution aqueuse résultante est ensuite évaporée à sec sous vide. Le résidu sec est repris par un mélange CH_3OH 0,5 % ClH ; cette solution alcoolique contient le pigment anthocyanique à côté de la rutine non transformée.

c) Isolement des produits de la réaction.

La solution précédente est ensuite fractionnée par chromatographie sur couches épaisses de cellulose avec le solvant n.butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 2,2 v/v) selon la technique habituelle. On y distingue essentiellement deux traînées : la traînée jaune de $R_f = 0,62$ est imputable à la rutine, tandis que la traînée rose de $R_f = 0,51$ indique la présence du pigment anthocyanique. L'élution de ce dernier est effectuée avec les mélanges $\text{CH}_3\text{OH} \sim \text{ClH}$ 0,5 % ou HCOOH 1,5 % - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1 : 2 v/v).

d) Purification.

L'éluat précédent est directement traité par un excès d'éther anhydre jusqu'à précipitation du pigment; on élimine le surnageant et le précipité est ensuite redissous dans CH_3OH 0,1 % ClH . La pureté du pigment est contrôlée par chromatographie dans divers solvants (Tableau XX).

Le pigment obtenu a les mêmes caractéristiques que le pigment S II isolé des plantules de seigle et que le pigment purifié obtenu par acétylation réductrice de la rutine selon la méthode de SESHADRI (11). Les spectres d'absorption de ce pigment et du cyanidol 3 rhamnoglucoside (S II) sont parfaitement concordants (Tableau XX).

La structure du pigment a été vérifiée par les méthodes décrites dans la 2ème Partie : par hydrolyse acide totale, on obtient bien du cyanidol, du rhamnose et du glucose dans le rapport molaire 1 : 1 : 1; il s'agit donc du cyanidol 3 rhamnoglucoside.

C. Etude de la réaction de réduction.

a) Etude qualitative.

La réduction est effectuée dans la cellule de 250 ml avec le solvant A comme électrolyte.

Conditions de la réduction :

potentiel cathodique : - 0,94 V.

I = 25 mA.

Poids de Hg. fraîchement distillé : 130 g.

Quantité de rutine : 14 mg. pour 200 ml. de solution.

Avant d'entreprendre l'électrolyse, on prend soin de désaérer la solution par barbotage d'azote pour éviter l'oxydation des produits de réduction. La réaction est suivie par dosage spectrophotométrique à 346 m μ de la quantité de rutine résiduelle contenue dans les échantillons prélevés successivement en cours de réduction (Fig. 18) et en même

R _f	SOLVANTS				Max. (m μ) CH ₃ OH 0,01% ClH	E 440m μ E Max. Vis.
	J Cellulose	CH ₃ COOH 30% cellulose	n. Butanol : 4 A. acétique : 1 Eau : 2,2 Cellulose	D Papier Whatman 1		
Pigment R. E.	0,22	0,70	0,51	0,50	.523 , 282	0,23
R. A.	"	"	"	"		
Témoin S _{II}	0,22	0,68	0,50	0,50	523 , 282	0,23
Rutine	0,24	0,70	0,62	0,90		

R.E. : Réduction électrolytique
R.A. : Acétylation reductrice.

TABLEAU XX

temps par analyse chromatographique des dépôts sur couches minces de cellulose (solvant 4 : 1 : 2,2).

La solution jaune au départ se décolore en cours de réduction ce qui indique la transformation de la rutine en produits réduits incolores. En fait, avant révélation, il n'apparaît sur les chromatogrammes des prélèvements que la tache de la rutine. La révélation des produits de réduction est obtenue par pulvérisation des chromatoplaques à l'aide d'acide p.toluène sulfonique à 3 % dans C_2H_5OH (A.P.T.S), suivie d'un chauffage à $110^\circ C$ à l'étuve pendant 5 mn. (14).

On met ainsi en évidence deux composés colorés en rose :

(I) $R_f = 0,55$ (le moins abondant).

(II) $R_f = 0,41$ (le plus important).

Par pulvérisation d'une solution méthanolique à 0,3 % de 2 - 6 dichloroquinone 4 chloroimide (D.C.Q), seul le composé (II) de $R_f = 0,41$ apparaît révélé en rose violacé. Il est donc probable que la nature des deux substances réduites n'est pas la même.

La réaction conduit donc essentiellement à deux produits réduits (I) et (II) qualitativement différenciés par les deux réactions chromogéniques précédentes.

b) Identification des pigments provenant du traitement des produits (I) et (II) à l' A.P.T.S. et à la D.C.Q.

1) Action de l' A.P.T.S.

2 ml. de la solution de rutine réduite sont chauffés à reflux pendant 3 mn. avec 0,5 ml. d'une solution alcoolique d' A.P.T.S. à 3 %. Après extraction à l'alcool amylique et concentration de la solution par évaporation sous vide, la chromatographie de l'extrait sur couches minces de cellulose (solvant $ClH_3N - HC_2OH$ 1 : 1 v/v) (14) (15) permet d'observer distinctement deux taches colorées l'une en rose, l'autre en rose violacé. La première de $R_f = 0,80$ n'est autre que le cyanidol 3 rhamnoglucoside; la seconde moins importante, de $R_f = 0,14$ correspond à un pigment que nous avons obtenu par réduction électrolytique d'une solution de dihydroquercétine (pentahydroxy 3 - 5 - 7 - 3' - 4' flavanone) dans le solvant A, suivie par traitement à l'A.P.T.S. ou au ClH_3 à chaud. Il se forme aussi dans ces conditions des traces de cyanidol.

2) Action de la D.C.Q.

On ajoute 5 ml. d'une solution alcoolique de D.C.Q. à 0,3 %, à 20 ml. de milieu réactionnel contenant la rutine non transformée et les produits de réduction (I) et (II). La solution se colore rapidement en rose et on extrait la D.C.Q. non transformée au benzène. La solution aqueuse résiduelle est ensuite traitée comme pour l'isolement du cyanidol 3 rhamnoglucoside.

Par chromatographie sur couches minces de cellulose (solvants 4 : 1 : 2,2; 3 : 1 : 20 et 1 : 1) (tableau XX), le nouveau pigment présente les mêmes caractéristiques que le cyanidol 3 rhamnoglucoside. En outre, les maximums d'absorption des deux pigments dans le solvant A sont identiques : $515 m\mu$.

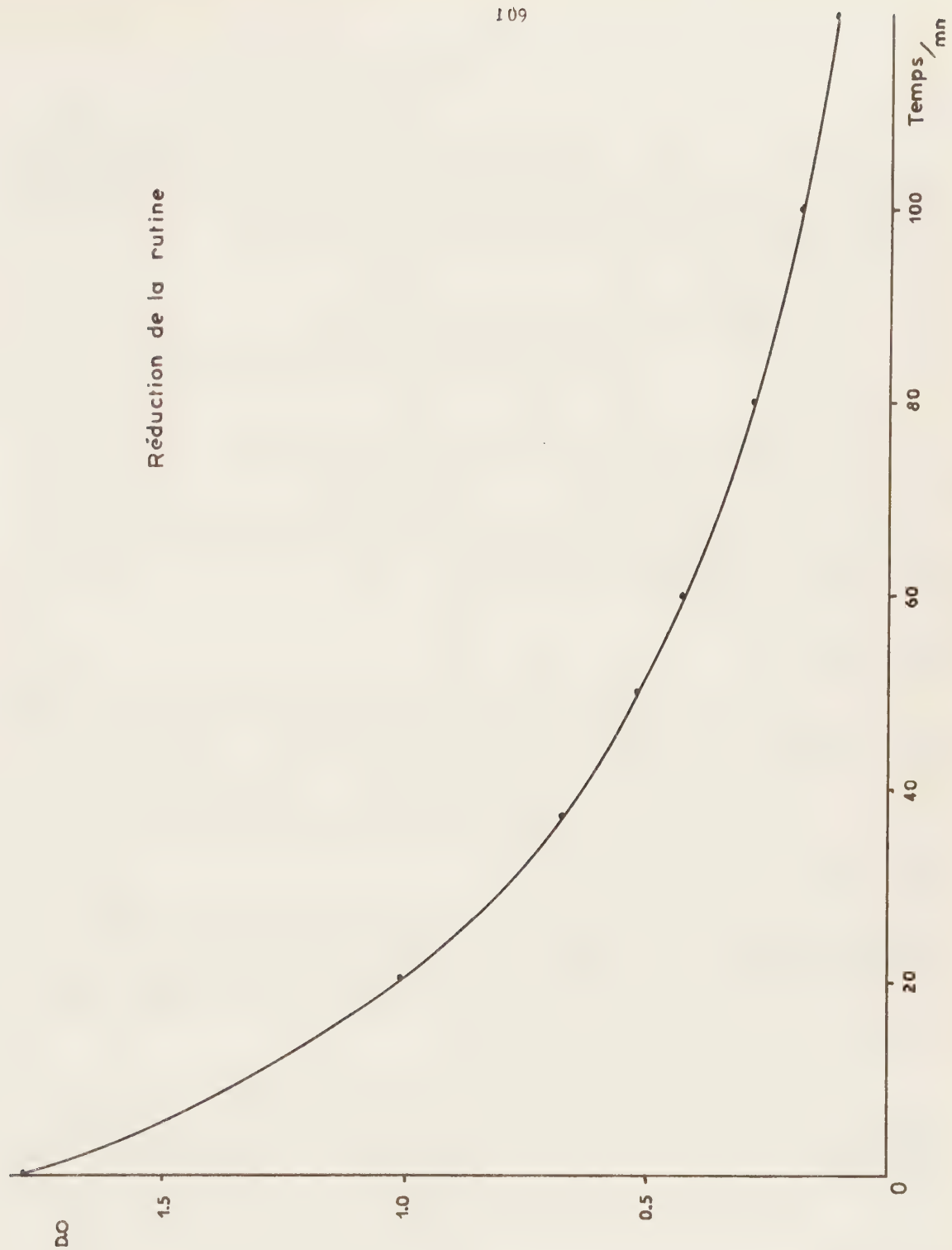


FIG. 18

3) Action de l'O₂ de l'air.

Si l'on fait passer de l'air dans 20 ml de la solution de réduction précédente, celle-ci se colore progressivement en rouge. Après 12 heures d'oxydation par l'oxygène de l'air, à température ambiante, le maximum d'absorption de cette solution se situe à 515 m μ . La densité optique 0,62 est rigoureusement la même qu'après traitement par la D.C.Q., ce qui confirme le rôle d'oxydant de ce réactif.

c) Dosage des produits de réduction (I) et (II).

1) Dosage des produits de réduction (I) et (II) à l'A.P.T.S. et à la D.C.Q.

La différence de comportement des produits (I) et (II) avec les réactifs précédents nous a permis de les doser en cours de réduction.

Le traitement du mélange réactionnel à l'A.P.T.S. permet de connaître la quantité globale des deux substances réduites (I) et (II). Avec la D.C.Q., on ne dose que le produit de réduction le plus abondant (II).

Mode Opératoire :

2 ml. du mélange réactionnel sont chauffés pendant 3 mn à reflux et à l'air avec 0,5 ml d'une solution alcoolique d'A.P.T.S. à 3 %. La solution prend rapidement une coloration rose et présente un maximum d'absorption à 518 m μ .

On ajoute 0,5 ml d'une solution méthanolique de D.C.Q. à 0,3 % à 2 ml du mélange réactionnel; la solution se colore immédiatement en rose et l'on observe dans ces conditions un maximum d'absorption à 515 m μ .

Pour suivre la formation relative de (I) et (II) au cours de la réduction, on prélève périodiquement sous azote et pendant 2 H 15, 2 échantillons, chaque fois, de 2 ml du mélange réactionnel. On les traite séparément comme indiqué ci-dessus. Chaque essai est ensuite complété à 5 ml avec du solvant de réduction A; puis, on détermine les densités optiques respectives à 515 et à 518 m μ .

Sur la Fig. 19, nous avons porté les 2 courbes obtenues dans ces conditions. La courbe (a) est représentative de la réactivité des produits réduits avec l'A.P.T.S. : chaque point de la courbe est fonction de la quantité globale des produits (I) et (II).

La courbe (b) traduit la réaction du composé (II) avec la D.C.Q. : chaque point figuratif de cette courbe est fonction de la quantité de (II) formé.

Le rapport des ordonnées pour un même prélèvement traduit ainsi la formation relative des composés (I) et (II).

Ce rapport fonction de $\frac{(II)}{(I) + (II)}$ a tendance à croître au fur et à mesure que la réduction progresse. Il est de 0,68 après 15 mn de réaction et se fixe aux alentours de 0,90 après 1 H 15 et demeure constant jusqu'à la fin de l'opération.

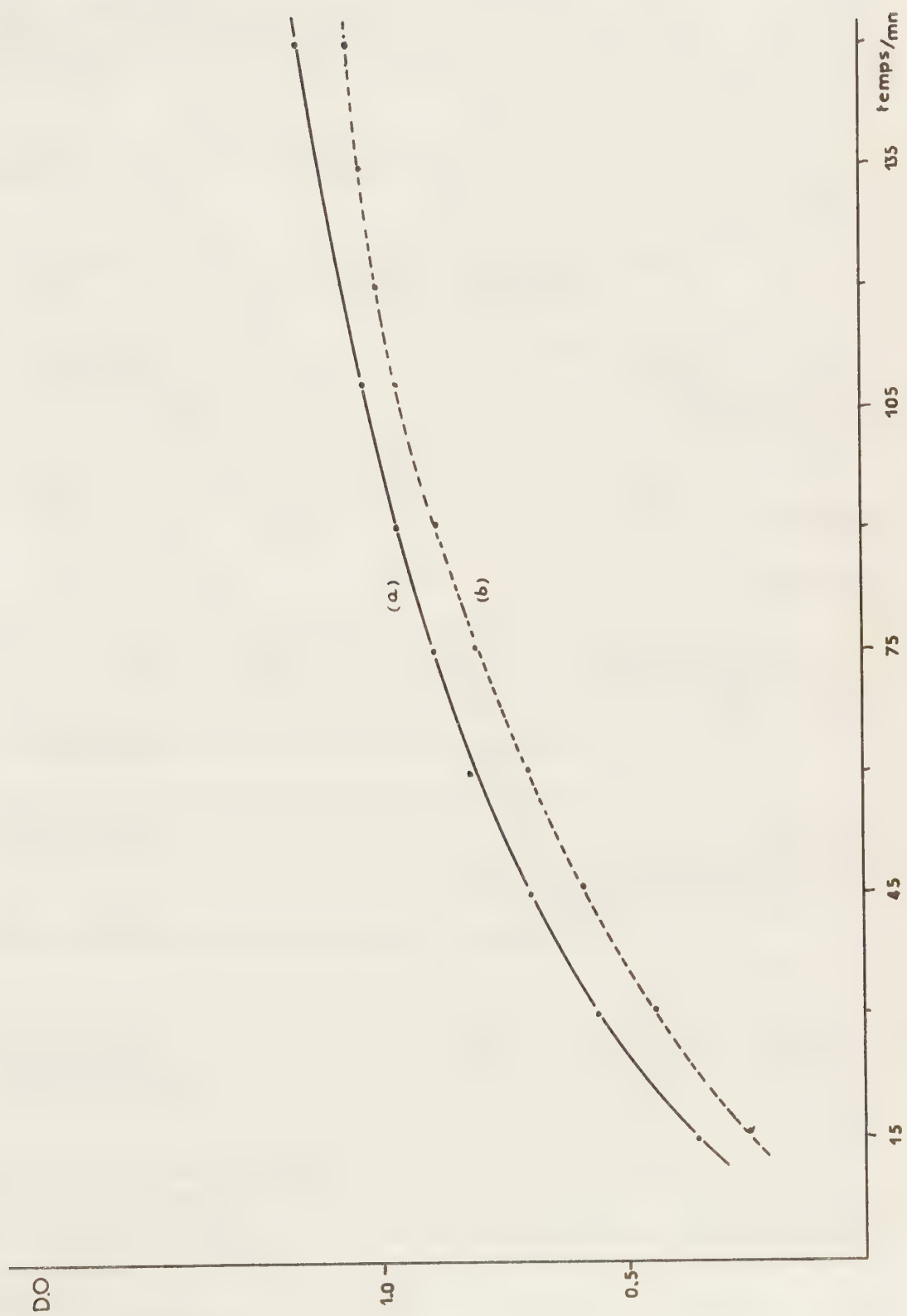
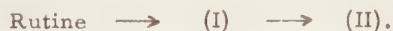


FIGURE 19

Dans ces conditions, (II) représente environ 90 % des produits de réduction formés. Il est probable, d'après les observations précédentes que (II) correspond à l'état de réduction le plus avancé tandis que (I) doit se trouver dans un état intermédiaire entre la forme flavonol et la forme (II).

Etant donné la structure du quercétol, aglycone de la rutine, on peut provisoirement schématiser la transformation par un processus de réduction en deux étapes :



2) Rendement de la transformation rutine $\longrightarrow$ pigment.

Nous avons établi le rendement de la réaction par spectrophotométrie par rapport à la rutine transformée. Pour $5,65 \cdot 10^{-6}$ moles de rutine transformée en solution dans 100 ml de milieu réactionnel, on obtient, après oxydation à l'air, $4,32 \cdot 10^{-6}$ moles de cyanidol 3 rhamnoglucoside, soit un rendement de 76 % en pigment.

En tenant compte du fait que seul (II) subit l'oxydation, le rendement de transformation : rutine $\longrightarrow$ (I) + (II) est voisin de 90 %.

REMARQUE :

Le rendement de la transformation de la rutine en cyanidol 3 rhamnoglucoside par réduction électrolytique, est le même que celui obtenu par traitement de ce flavonol par réduction à l'amalgame de Zn dans le solvant A (76 %).

3) Dosage du produit de réduction (II) par potentiométrie.

Le dosage du produit de réduction (II) est effectué par oxydation à l'aide d'une solution titrée de D.C.Q. suivi du dosage en retour de l'excès de réactif par Ti Cl_3 . Nous avons utilisé une électrode à gouttes de mercure et un dispositif potentiométrique classique avec enregistrement pour déterminer le point d'équivalence : D.C.Q./ Ti Cl_3 .

La D.C.Q. est électroactive sur l'électrode à gouttes de Hg et sans action sur l'électrode de Pt.

On détermine la quantité de Ti Cl_3 nécessaire pour réduire 3 ml de D.C.Q. (0,056 N) puis on ajoute cette même quantité de réactif à 100 ml de la solution de réduction contenant la rutine non transformée et les produits (I) et (II). L'oxydation est achevée en quelques minutes et l'excès de réactif est éliminé par extraction avec du benzène.

La solution benzénique est évaporée à sec; le résidu est ensuite redissous dans 100 ml de solvant A. On dose la D.C.Q. en excès par potentiométrie avec Ti Cl_3 dans les mêmes conditions que ci-dessus, soit $6,5 \cdot 10^{-6}$ moles la quantité équivalente de D.C.Q. consommée par (II).

La quantité de rutine transformée au cours de la même opération a été déterminée par spectrophotométrie, soit $9,1 \cdot 10^{-6}$ moles.

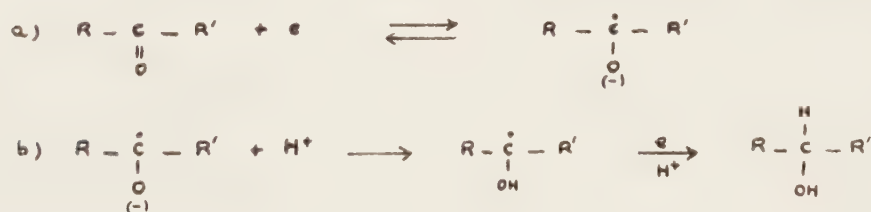
Compte tenu du rendement de la réaction de réduction établi précédemment ($R^{dt} = 76 \%$), il est vraisemblable que la réaction de la D.C.Q. avec le produit de réduction (II) fait intervenir un mole de chaque espèce ce qui confirme le rôle d'oxydant de l'halogène.

CHAPITRE III

MECANISME DE LA TRANSFORMATION DE LA ROUTINE EN CYANIDOL 3 RHAMNOGLUCOSIDE

a) Réduction.

La réduction du $>C = O$ des cétones par voie électrolytique se fait en deux étapes et peut être schématisée par les équations suivantes :



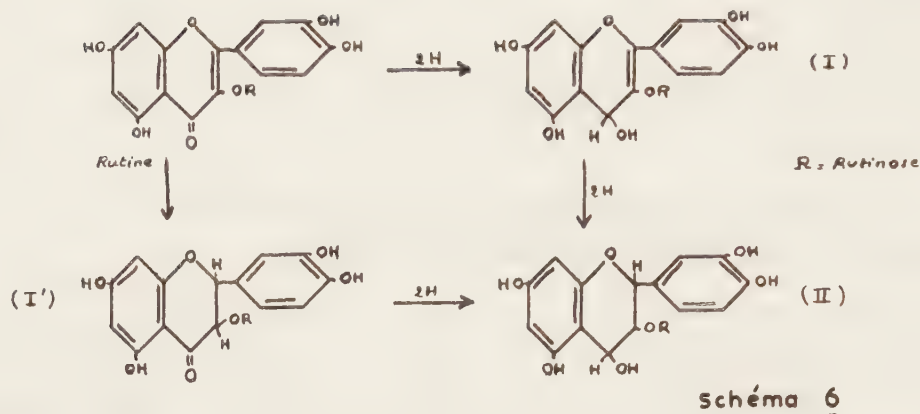
Ces réactions supposent une tension suffisante et une concentration en cétone inférieure à 10^{-2} M/l.

D'après ce qui précède, nous pouvons penser que la réduction électrolytique de la routine sur cathode de mercure s'effectue essentiellement par réduction du $>C = O$ et conduit à deux produits (I) et (II) . (Schéma 6).

Pour justifier cette interprétation, on peut envisager deux étapes dans la réaction : dans la première, le $>C = O$ du flavonol fixe 2 H, ce qui conduit au produit de réduction (I); dans la seconde, la fixation de deux H supplémentaires sur la double liaison 2 = 3 transforme (I) en (II).

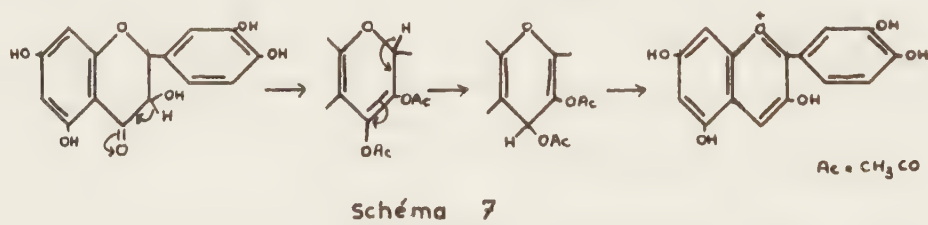
En général, la réduction d'une double liaison située en α par rapport au $>C = O$ est rapide et a lieu de façon préférentielle; c'est pourquoi, on peut encore envisager comme première étape de la réaction la formation du dihydroflavonol (I'); la fixation de 2 H sur le $>C = O$ de (I') conduirait, dans une deuxième étape, au composé le plus réduit (II).

La discrimination entre les structures (I) et (I') est fondée sur l'observation suivante :



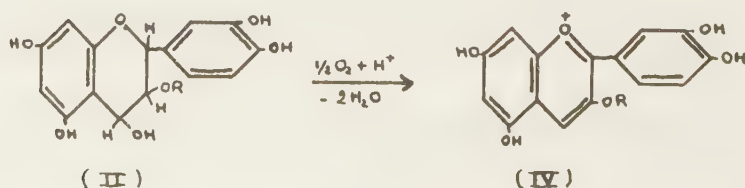
Les dihydroflavonols et leurs hétérosides ne sont pas transformés en sels de flavylum, ni par traitement à l'A.P.T.S. en milieu aqueux, ni par oxydation à la D.C.Q.

Nous avons vu aussi que le produit de réduction (I) n'était pas oxydé par l'air ou par la D.C.Q. mais subissait la transformation en cyanidol 3 rhamnoglucoside par élimination d'eau en milieu acide. Il est donc probable que sa structure corresponde plutôt à la forme flavène 2-3 ol 4 qu'à la forme flavanone. SESHADRI (11) a montré par ailleurs que la forme flavène 2-3 ol 4 est intermédiaire dans la transformation des 3 hydroxy - flavanones en sels de flavylum (Schéma 7).



b) Oxydation de (II).

L'oxydation par l' O_2 de l'air du produit (II) en milieu aqueux et acide, suivie d'une élimination d'eau, conduit au pigment anthocyanique correspondant.



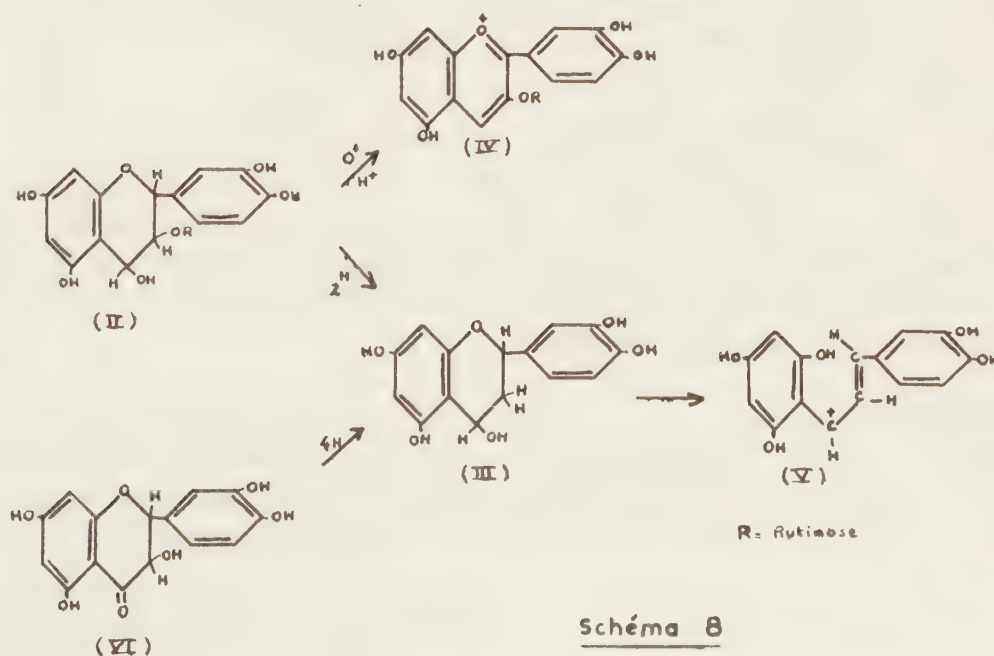
Ce processus rend, en fait, la transformation de (II) en sel de flavylum dépendante de l'oxydation.

L'oxydation par la D.C.Q. s'explique par l'intervention de l'halogène. On peut penser qu'il y a, en milieu aqueux et acide, oxydation de (II) suivie d'une élimination d'eau.

Reste à expliquer pourquoi le traitement à chaud du mélange de réduction par l'A.P.T.S. conduit à deux pigments : le cyanidol 3 rhamnoglucoside (IV) et un pigment violacé (V) Rf : 0,14 (solvant 4 : 1 : 2,2).

L'action de l'A.P.T.S. sur le produit de réduction (I) donne exclusivement du cyanidol 3 rhamnoglucoside identifié chromatographiquement; (II), dans les mêmes conditions, se transforme en cyanidol 3 rhamnoglucoside et il apparaît une très petite quantité de pigment violacé (V).

(V) a été identifié par chromatographie au pigment résultant du traitement acide du produit de réduction électrolytique de la dihydroquercétine (pentahydroxy 3 - 5 - 7 - 3' - 4' flavanone). Ce pigment n'étant pas stable, nous n'avons pas pu déterminer sa structure; il est probable cependant qu'elle est apparentée à celle des composés colorés décrits par GEISSMAN et CLINTON (16). Ces produits prennent naissance par traitement des 4 hydroxyflavanes en milieu acide.



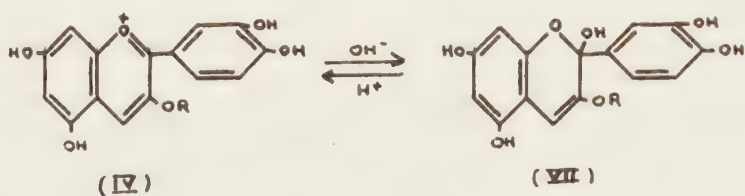
Par oxydation et élimination, (II) donne (IV) ~~mais~~, En même temps, la rupture partielle de la liaison 3 glycosidique, sans doute par un processus d'hydrogénolyse, entraîne la formation intermédiaire d'une petite quantité de dérivé III. Ce dernier s'obtient aussi par réduction de la dihydroquercétine et présente vraisemblablement la structure flavane ol 4. Par action de l'A.P.T.S. et à chaud, le flavane ol 4 est ensuite transformé en (V) probablement par ouverture de l'hétérocycle.

Il est intéressant de remarquer que la présence d'une substitution sur l'OH en 3 sous forme d'une liaison glycosidique stabilise la forme énol et facilite le processus de transformation en sel de 3 hydroxyflavylium.

CHAPITRE IV

REDUCTION ELECTROLYTIQUE DU CYANIDOL 3 RHAMNOGLUCOSIDE

En milieu faiblement acide, les sels de flavylium sont en équilibre avec leur pseudobases (VII). Ces dernières se forment normalement par hydrolyse des sels de flavylium en milieu aqueux à pH voisin de 3. Cette transformation réversible se manifeste par une décoloration typique des solutions de pigments anthocyaniques.



La structure (I) étant une forme isomère de la pseudobase (VII), il était intéressant de vérifier, à la suite des essais précédents, si la forme phényl 2 benzopyrylium est réduite en un composé de structure voisine ou identique à celle du produit (II). En fait, nous avons observé cette transformation.

Mode opératoire :

200 ml d'une solution de cyanidol 3 rhamnoglucoside dans le solvant A ($D_0 = 1,61$) sont soumis à réduction pendant 10 h jusqu'à décoloration complète dans des conditions analogues à celles indiquées pour la réduction de la rutine.

D'après la courbe de polarisation (Fig. 17), la réaction a été effectuée à potentiel constant ($-1,07 \text{ V.}$).

Cette courbe indique une réduction en deux étapes; cependant, les deux paliers sont trop rapprochés pour permettre d'isoler le premier produit de réduction.

La solution réduite est ensuite aussitôt analysée par chromatographie sur couches minces de cellulose (solvant 4 : 1 : 2,2). Par révélation à l' A.P.T.S., il apparaît deux taches colorées en rose (a) et (b) : Rf (a) = 0,43 (la plus intense).

Rf (b) = 0,60 (la moins importante).

Le composé (a) apparaît coloré en rose lilas par action de la D.C.Q. tandis que (b) n'est pas révélé.

Les Rf (a) et (b) sont les mêmes que ceux de (II) et (I); leur comportement chromogénique avec les réactifs A.P.T.S. et D.C.Q. est identique.

- L'oxydation à l'air du milieu réactionnel incolore régénère le cyanidol 3 rhamnoglucoside : on observe l'oxydation de (a) tandis que (b) demeure inchangé.

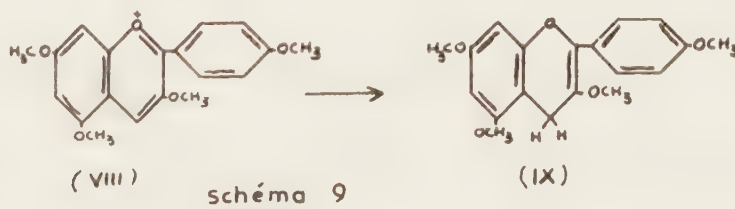
- La D.C.Q oxyde immédiatement le composé (a) en cyanidol 3 rhamnoglucoside tandis que (b) demeure inchangé.

- L'action de l' A.P.T.S. et de ClH sur (a) et (b) est la même que sur les produits de réduction (II) et (I) de la rutine.

Nous identifions (a) et (b) aux produits de réduction (II) et (I) de la rutine.

Comment expliquer cette identité de comportement puisque la structure phényl 2 benzopyrylium ne comporte pas de groupement C=O . KARRER et SEYHAN (17) ont obtenu le phényl 2 dihydrobenzopyrane par réduction du pelargonidol tétra méthyl éther (VIII) avec LiAlH_4 en solution dans du tétrahydrofurane.

D'après FREUDENBERG et WEINGES (18), le produit de cette réaction serait un flavène 2 - 3 (IX) (Schéma 9).



On ne peut admettre cependant cette structure pour les produits (a) ou (b). La réduction du cyanidol 3 rhamnoglucoside à l'aide de LiAlH_4 dans le tétrahydrofurane conduit à des produits de réduction dont le comportement chromatographique est complètement différent de celui de (a) et (b).

Le plus simple est d'envisager la formation, par hydratation de C_4 , d'un intermédiaire flavène 2 - 3 ol 4, isomère de la pseudobase (VII) et de même structure que (I). La réduction de ce dernier conduirait à (II).

Pour étayer ce point de vue, rappelons que HILL et MELHUISH (19) admettent la formation intermédiaire d'un flavène 2 - 3 ol 4 par traitement des sels de flavylum en milieu alcalin au cours de la transformation de ces derniers en flavones. (Schéma 10).

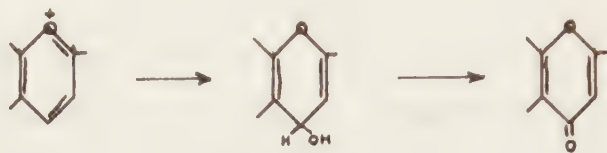


Schéma 10

Ce n'est là cependant qu'une pure hypothèse.

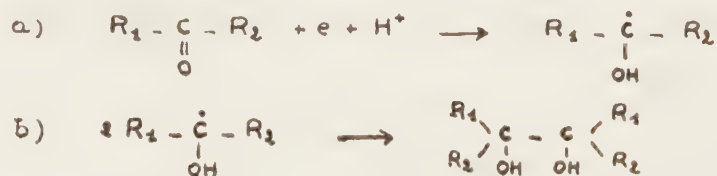
Appendice :

Lorsque la réduction de la rutine est effectuée dans le solvant B, plus acide que le précédent (pH 0,6 - 1), on obtient à côté du cyanidol 3 rhamnoglucoside des produits de duplication du type bisflavenylidène (travail en préparation).

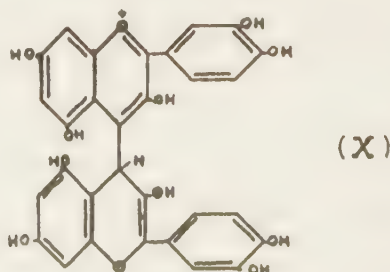
En milieu acide, ces composés se déshydratent et donnent des pigments hétérosides colorés en rouge dont l'aglycone possède, d'après NIERENSTEIN (2) et JURD (20), la structure 4 flavényl flavylum (X).

Par hydrolyse acide totale, nous avons pu caractériser, à côté du rhamnose et du glucose, l'aglycone dont le comportement chromatographique est le même que celui du pigment de JURD obtenu par acétylation réductrice de la quercétine (20).

On peut admettre, dans ce cas, un processus de réduction suivi de duplication.



La duplication du radical précédent entraîne la formation d'un pinacol; ce dernier est ensuite transformé en flavényl 4 flavylum par élimination intermédiaire de $2 \text{ H}_2\text{O}$ en milieu acide (X).



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUESIIIème PARTIE

- 1 Willstätter R. et Mallison H., Sitzber.preuss.Akad.Wiss., Physik, math.Kl (1914) 34, 769.
- 2 Malkin T. et Nierenstein M., J. Amer. Chem. Soc., (1930) 52, 2864.
- 3 Watson E.R. et Meek, J. Chem. Soc. (1915) 107, 1576.
- 4 Asahina Y. et Inubuse M., Ber. (1931) 64, 1256.
- 5 Karrer P., Yen Y. et Reichstein T., Helv. Chim. Acta (1930) 13, 1308.
- 6 Ribéreau-Gayon J. et Gardrat J., C.R. (1956), 243, 788.
- 7 Mirza R. et Robinson R., Nature (1950) 166, 997.
- 8 Bauer L., Birch A.J. et Hillis W.E., Chem. et Indust. (London) (1954) 433.
- 9 King H. et White T., J. Chem. Soc., (1957) 3701.
- 10 Laumas K. et Seshadri T., Proc. Ind. Acad. Sci. (1959) 49, 47.
- 11 Krishnamurty H., Krishnamoorthy V. et Seshadri T., Phytochemistry (1963)2, 47.
- 12 Harborne J.B., Phytochemistry (1964) 3, 151.
- 13 Bancroft W.D. et Rutzler J.E., J. Amer. Chem. Soc., (1938), 60, 2738.
- 14 Roux D.G., Nature (1957) 180, 973.
- 15 Roux D.G., Nature (1957) 179, 305.
- 16 Geissman T.A. et Clinton R.O., J. Amer. Chem.Soc. (1946) 68, 700.
- 17 Karrer P. et Seyhan M., Helv. Chim. Acta (1950) 33, 2209.
- 18 Freudenberg K. et Weinges K., Annalen, (1954) 590, 140.
- 19 Hill D.W. et Melhuish R.R., J. Chem. Soc. (1935) 1163.
- 20 Bergot B.J. et Jurd L., Tetrahedron (1965) 21, 657.

IVème PARTIE

Essais sur la biogénèse et la biosynthèse des pigments anthocyaniques du seigle et du chou rouge

CHAPITRE I **GENERALITES.**

- A. Influence de la lumière sur l'anthocyanogénèse.
- B. Hypothèses.

CHAPITRE II INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA FORMATION DES ANTHOCYANES DES PLANTULES DE SEIGLE ET DE CHOU.

- A. Influence de la lumière sur la formation des anthocyanes du seigle.
 - a) Mode opératoire.
 - b) Influence de l'éclairement.
- B. Influence de la lumière sur la formation des anthocyanes du chou.
- C. Influence de la lumière sur l'incorporation de la phényl alanine 3 - ^{14}C dans les pigments du chou.

CHAPITRE III INCORPORATION DE PRECURSEURS DIVERS DANS LES PIGMENTS DES PLANTULES DE SEIGLE ET DE CHOU.

- A. Rapport des activités propres au pigment C I et aux groupement acylés des pigments du chou.
- B. Incorporation du cyanidol 3 glucoside dans les pigments du seigle.
 - a) Formation des hétérosides phénoliques.
 - b) Isolement du cyanidol 3 glucoside marqué ^{14}C .
 - c) Alimentation des plantules de seigle en cyanidol 3 glucoside marqué ^{14}C .
- C. Incorporation de cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside ^{14}C dans les pigments du chou.
- D. Incorporation de dihydroquercétol dans les plantules de chou.

CHAPITRE IV ESSAI DE BIOSYNTHESE DES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES IN VITRO.

CHAPITRE V TRANSFORMATION DE LA TYROSINE EN ACIDE P.COUMARIQUE.

IVème PARTIEESSAIS SUR LA BIOGENESE ET LA BIOSYNTHESE DES PIGMENTS
ANTHOCYANIQUES DU SEIGLE ET DU CHOU ROUGE

A l'heure actuelle, l'étude de la biosynthèse des pigments anthocyaniques dans les végétaux est engagée dans deux voies différentes complémentaires.

Les études physiologiques de ces dernières années se sont attachées à faire ressortir l'importance de certains facteurs sur l'anthocyanogénèse. Parmi les mieux connus, signalons l'influence de la lumière et de quelques inhibiteurs ou activateurs. Ces travaux ont mis en évidence le rôle prépondérant de la lumière et l'existence de deux systèmes photorécepteurs indépendants de la photosynthèse.

Les études biogénétiques ont porté de préférence sur l'incorporation de précurseurs radioactifs dans le **squelette** flavanique et ont abouti à des conclusions très importantes :

a) le squelette des anthocyanes et des flavonoides résulte de la condensation d'une unité phényl propane avec trois unités acétate, ces dernières étant associées tête à queue pour former le cycle A.

b) le noyau phényle de l'unité phényl propane s'incorpore intact dans le cycle B.

Nous nous sommes proposé d'étudier l'influence de la lumière sur la formation des pigments anthocyaniques dans les plantules de seigle et de chou rouge.

Nous avons voulu, d'une part définir les conditions les plus favorables à l'incorporation d'un précurseur tel que la phényl alanine dans le cycle B des anthocyanes et, d'autre part, préciser les circonstances les mieux adaptées à une biosynthèse in vitro.

Nous nous sommes ensuite attaché à préciser les étapes de la glycosidation et de l'acylation dans les pigments anthocyaniques des plantules de seigle et de chou rouge par incorporation de cyanidol 3 glucoside et de cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside radioactifs.

Dans cette dernière série d'essais, la biosynthèse in vitro des pigments anthocyaniques sous l'action de la lumière a été mise en évidence.

CHAPITRE I

GENERALITES

A. Influence de la lumière sur l'anthocyanogénèse.

En 1957, SIEGELMAN et coll. (1) aux U.S.A., et MOHR en Allemagne (2) font simultanément la même observation : la biosynthèse des anthocyanes dans les plantules de chou rouge (*Brassica oleracea*) et de moutarde blanche (*Brassica alba*) dépend de l'absorption de la lumière par deux photorécepteurs. Ceux-ci sont indépendants du système responsable de l'activité photosynthétique :

- le premier photorécepteur de faible énergie ($P\ 660 \rightleftharpoons P\ 730$) exerce une action réversible sur la formation des anthocyanes; il est influencé par l'action de la lumière rouge clair (660 m μ .) qui induit la synthèse et de la lumière rouge sombre (730 m μ .) qui, inversement, la ralentit. Ce système s'identifie au " phytochrome " P de SIEGELMAN, BUTLER, HENDRICKS et BORTHWICK (3) (4).

- le deuxième photorécepteur dit de haute énergie (H.E.R.) exerce une action favorable sur la biosynthèse des anthocyanes en lumière bleue (450 m μ .) et en lumière rouge sombre (690 m μ .).

Dans la plupart des végétaux (chou, moutarde (1), (2)), ces deux systèmes sont étroitement associés et il est difficile de séparer leurs actions.

Dans les plantules de navet (1) et dans les pelures de pommes (5) la formation des anthocyanes ne dépend que de la réaction de H.E.R. Dans les plantules de sorgho (6), les deux photorécepteurs sont nettement séparés; il est commode dans ces conditions de mettre en évidence l'influence propre de chacun d'eux sur la biosynthèse des pigments anthocyaniques.

Pour MOHR et VAN NES (7), la réaction de haute énergie (H.E.R.) a seule une action prépondérante sur la formation des pigments anthocyaniques des plantules de sarrasin : la lumière rouge sombre (718 m μ .) et la lumière bleue (440 m μ .) induisent la formation d'une plus grande quantité d'anthocyanes que le phytochrome. BREGEAUT et ROLLIN (8) obtiennent le même résultat avec des plantules de *Phacelia tanacetifolia* et concluent eux aussi que le système H.E.R. induit la formation de trois fois plus d'anthocyanes que le phytochrome seul.

Selon HARRASSCHAIN et MOHR (9), la lumière bleue exerce une action plus efficace sur la biosynthèse des anthocyanes dans les plantules de sarrasin que sur la formation des flavonols.

D'après KANDELER (10), la lumière blanche a les mêmes effets que la lumière rouge sombre sur la formation des anthocyanes dans les plantules de trois Crucifères.

B. Hypothèses.

Bien que la nature du photorécepteur du système H.E.R. ne soit pas connue, MOHR et coll. (2) pensent qu'il s'agit d'une flavoprotéine à cuivre dont l'activité ne se manifeste que pendant le temps où elle absorbe l'énergie lumineuse (11). Cette activité est complètement indépendante de l'action du phytochrome. C'est la raison pour laquelle MOHR et coll. (11) puis ROLLIN (8) admettent que la synthèse des anthocyanes dans les cellules épidermiques des végétaux " n'est que la manifestation élégante d'une transformation métabolique, après absorption de la lumière, par deux photorécepteurs ".

La lumière ne serait donc que la cause indirecte de la biosynthèse des anthocyanes (11). Cette opinion est partagée à l'heure actuelle par la plupart des auteurs.

Les conclusions de HARRASSCHAIN et MOHR (9) permettent dans une certaine mesure de faire le point des connaissances actuelles dans ce domaine : la synthèse des anthocyanes dépend à la fois de la quantité de précurseur disponible et de l'accroissement d'énergie libre résultant de l'absorption de la lumière par les photorécepteurs.

CHAPITRE II

INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA FORMATION DES ANTHOCYANES DES PLANTULES DE SEIGLE ET DE CHOU

Dans la plupart des travaux de photophysiology, les auteurs se sont préoccupés d'établir, pour un végétal donné, le spectre d'action de la lumière sur la formation des anthocyanes. Notre but a été, dans les expériences qui suivent, d'étudier directement l'influence de la lumière blanche en n'envisageant pas le rôle spécifique de chacun des photorécepteurs qui peuvent influencer l'anthocyanogénèse.

A. Influence de la lumière sur la formation des anthocyanes du seigle.

Pour le seigle, l'anthocyanogénèse n'est qu'une période transitoire qui se manifeste en début de croissance par une coloration rose des plantules. Par suite de la formation des chlorophylles, les plantules prennent rapidement une coloration verte homogène. La teneur en pigments anthocyaniques par unité de poids de matériau vert croît rapidement pour atteindre un maximum et décroît ensuite jusqu'à disparition complète aux environs du 12ème jour de croissance.

Nous avons étudié l'influence de la lumière sur la croissance des plantules de seigle et la formation des pigments anthocyaniques.

a) Mode opératoire.

Les plantules sont cultivées sur vermiculite suivant la technique décrite

dans la 1ère Partie de notre travail. La croissance des plantules, pendant la période comprise entre les semailles et le 8ème jour a lieu à l'obscurité complète. Les plantules sont soumises ensuite à différents régimes d'éclairement et d'obscurité pour préciser les conditions les mieux adaptées à la formation des anthocyanes. La lumière, rappelons-le, est fournie par quatre tubes fluorescents type lumière du jour installés à une distance moyenne de 30 cm au-dessus de la culture. Le développement et la croissance des plantules s'effectuent à la température constante de 20° C.

Pour un régime d'éclairement donné, la formation des anthocyanes dans les plantules est suivie par dosages spectrophotométriques des pigments à 520 m μ en fonction du temps. A cet effet, on prélève des échantillons d'environ 3 g de plantules que l'on traite de la manière suivante :

Les plantules récoltées sont immédiatement congelées à -78° C et extraites selon la technique déjà décrite.

Pour un échantillon de 3 g environ, nous utilisons 75 ml d'acétone à 80 % et 75 ml d'éther. Nous prenons la précaution de centrifuger l'extrait acétonique pour éliminer les particules en suspension. La phase aqueuse est lyophilisée, puis on dissout le résidu sec dans 5 ml de mélange eau-méthanol-acide chlorhydrique conc. (100 : 100 : 0,8) v/v. La D.O. de la solution précédente est mesurée à 520 m μ .

Pour comparer les quantités de pigments obtenues avec différents régimes d'éclairement, nous avons exprimé les résultats en unités arbitraires (D.O. par gramme de plantules récoltées) en fonction du temps. Sur la Fig. 20, nous avons porté la courbe de formation des pigments en fonction du temps de croissance pour des plantules maintenues 8 jours à l'obscurité et soumises ensuite à un régime d'éclairement continu et intermittent à raison de 2 minutes d'éclairement pour 4 minutes d'obscurité (courbe a). Nous avons représenté également la courbe exprimant le poids moyen d'une plantule en fonction du temps de croissance (courbe b). L'anthocyanogénèse se manifeste dans ces conditions par une synthèse très active qui atteint son maximum entre 20 et 30 heures, après la mise en éclairement de la culture. On y distingue deux périodes nettement séparées :

- une période de latence de 5 à 6 heures au cours de laquelle la formation des pigments est très ralentie.

- une période de synthèse très active limitée à une vingtaine d'heures. Succède ensuite à cette période de synthèse une période d'une trentaine d'heures durant laquelle on observe une diminution caractéristique des pigments anthocyaniques. La formation d'oxydases semble être une des causes de cette transformation (12).

Dans la phase suivante qui se prolonge jusqu'aux environs du 12ème jour d'éclairement, les pigments anthocyaniques sont dilués proportionnellement à l'accroissement du poids moyen des plantules.

b) Influence de l'éclairement.

Nous avons étudié ensuite l'influence de l'éclairement à intensité constante



FIG. 20 : Formation des pigments en fonction du temps d'éclairement (courbe a)
Variation du poids moyen d'une plantule en fonction du temps (courbe b)

sur la formation des pigments. Nous avons fait deux essais de même durée avec des éclairagements différents : dans le premier, les plantules reçoivent un éclairage continu; dans le second, l'éclairage est cyclique (2 mn d'éclairage, 4 mn d'obscurité) et représente le 1/3 de l'éclairage du premier essai.

Nous avons représenté sur la Fig.21 les courbes (1) et (2) correspondant aux essais précédents; elles présentent l'une et l'autre une période de latence de 4 à 5 heures environ.

La phase de synthèse active est linéaire dans les deux cas; la quantité de pigments formés au cours de l'essai avec éclairage continu est approximativement trois fois plus importante que la quantité de pigments obtenue dans l'essai avec éclairage intermittent.

D'après les résultats de DOWNS et SIEGELMAN (6) concernant les plantules de sorgho, on aurait pu s'attendre à priori à une synthèse relativement plus importante avec l'éclairage intermittent.

L'anthocyanogénèse se manifeste également dans les plantules maintenues à l'obscurité par une synthèse très ralentie mais pas négligeable. Il est donc certain que l'équipement enzymatique nécessaire à la réaction manifeste son activité indépendamment de l'action de la lumière; celle-ci n'a qu'un rôle d'activateur.

La courbe (1') (Fig.21) correspond à la formation des pigments dans les plantules exposées à la lumière pendant des temps croissants et maintenues ensuite à l'obscurité pendant 24 heures avant dosage. Cette courbe met en évidence l'importance de la phase sombre au cours de laquelle la biosynthèse des pigments se poursuit.

Cet ensemble d'observations montre que l'anthocyanogénèse dans les plantules de seigle se manifeste dans son ensemble de manière comparable à la formation des pigments anthocyaniques dans les plantules de sorgho (6).

Il est à noter encore que l'influence de la lumière sur la nature des pigments formés ne paraît pas établie.

A l'obscurité complète, les plantules ne contiennent pratiquement que du pigment S I. Dans les plantules étiolées soumises à l'influence de la lumière, S I, S II, S III se développent en même temps; la lumière ne joue apparemment que le rôle d'activateur.

B. Influence de la lumière sur la formation des anthocyanes du chou.

Les plantules de chou présentent, à l'encontre des plantules de seigle, une pigmentation permanente.

SIEGELMAN et HENDRICKS (1) ont étudié l'influence de la lumière sur les plantules de chou étiolées.

Nous nous sommes intéressés à l'influence de la lumière sur la répartition



FIG. 21 : Formation des pigments anthocyaniques dans les plantules de seigle en fonction du régime d'éclairement :

(1) : éclairage intermittent (1/3 E - 2/3 0).

(2) : éclairage continu.

(1') : plantules soumises à éclairage intermittent et maintenues ensuite, pendant 24 heures, à l'obscurité.

des pigments dans les folioles et dans les tiges de plantules étiolées âgées de 8 jours.

La synthèse est très active dans les folioles où elle semble être surtout localisée.

Sur les courbes (I) et (II) (Fig.22), nous avons porté en ordonnée la quantité de pigments formée par gramme de folioles et de tiges fraîchement récoltées et en abscisse le temps pour un régime d'éclairement cyclique (2 mn d'éclairement; 4 mn d'obscurité).

La formation des pigments dans les folioles ne présente pas de phase de latence; la synthèse est instantanément activée sous l'effet de la lumière et se poursuit à vitesse constante pendant plusieurs heures. On observe par contre pour les tiges une phase de latence de quelques heures comme pour les plantules de seigle.

C. Influence de la lumière sur l'incorporation de la phényl alanine 3-¹⁴C dans les pigments du chou.

La quantité de pigments anthocyaniques formée dans les plantules de chou est environ de 6 à 8 fois supérieure à celle des plantules de seigle. C'est pourquoi nous avons choisi le chou pour vérifier comment s'effectue l'incorporation de la phényl alanine 3-¹⁴C selon que les plantules sont éclairées ou maintenues à l'obscurité.

Pour préciser l'importance relative de l'incorporation au cours des phases claire et sombre, nous avons procédé à 4 essais : 1, 2, 3, 4.

La période d'éclairement est de 14 heures; une période d'obscurité de 24 heures lui succède.

L'alimentation des plantules en phényl alanine 3-¹⁴C est faite de manière différente pour chaque essai :

- Essai 1 : pendant la période obscure seulement.
- Essai 2 : pendant toute la durée de l'essai, à la fois au cours de la période claire et de la période obscure.
- Essai 3 : pendant la période claire seulement. Les plantules sont soigneusement lavées pour éliminer le précurseur radioactif avant mise à l'obscurité.
- Essai 4 : l'alimentation radioactive a lieu pendant 14 heures en présence de lumière seulement. Les plantules sont récoltées dès la fin de la période d'éclairement.

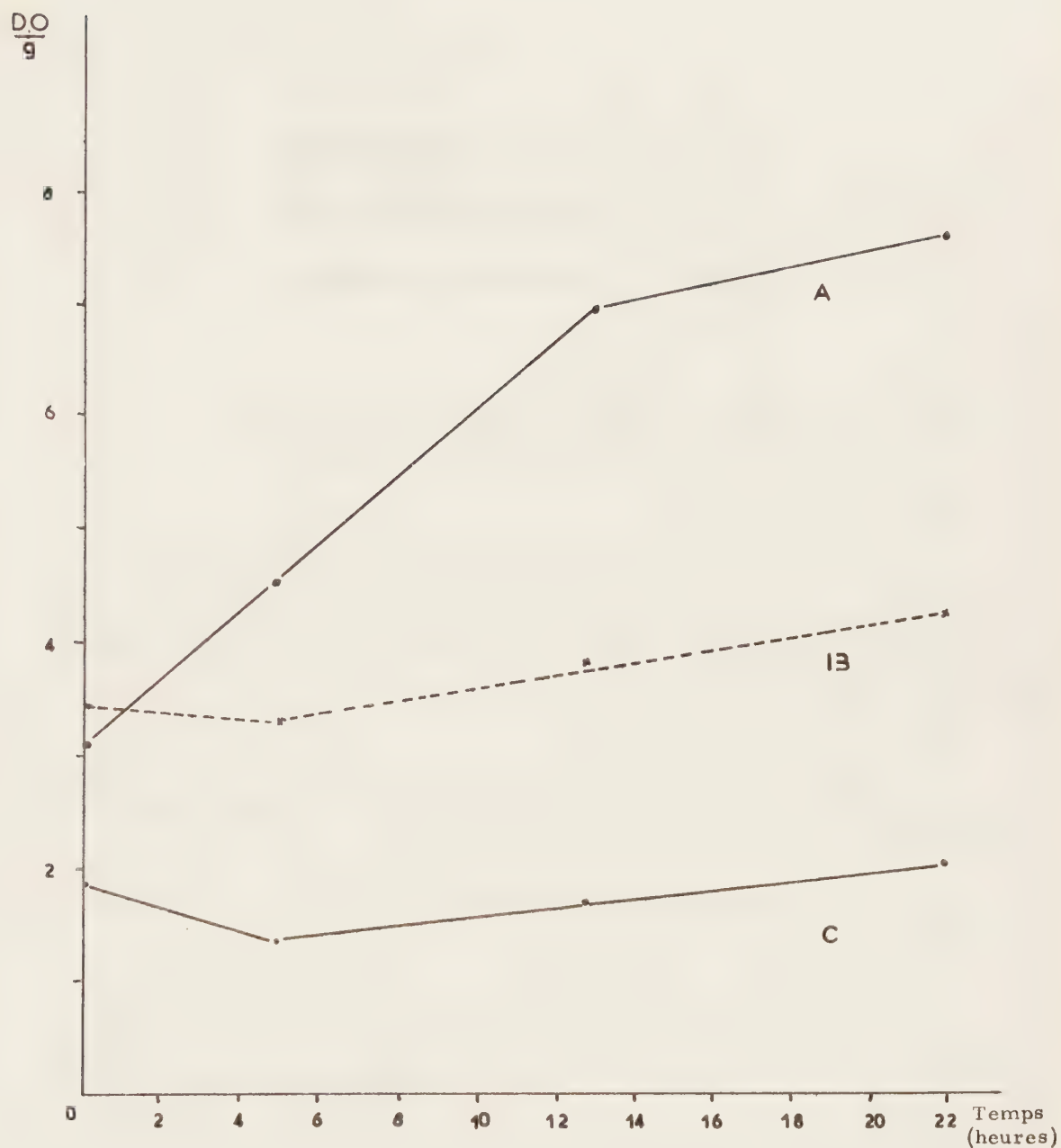


FIG. 22 : Formation des pigments anthocyaniques dans différentes parties de la plantule de chou en fonction du temps d'éclairement :

- A. Folioles
- B. Partie intermédiaire comprise entre les folioles et la tige
- C. Tige

L'expérience est schématisée Figure 23.

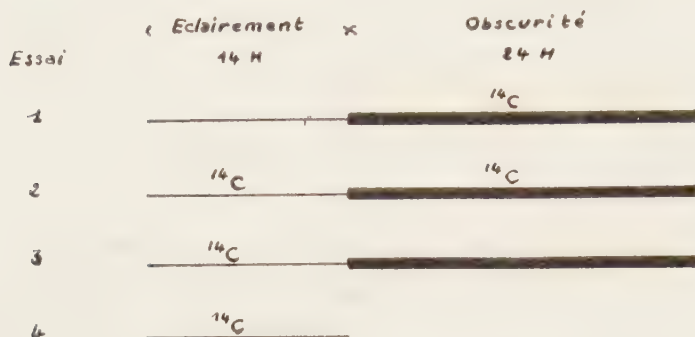


FIG. 23 : Schéma de l'alimentation en phényl alanine 3- ^{14}C , d'après le régime d'éclairement des plantules de chou rouge.

Chaque essai porte sur 90 plantules étiolées âgées de 8 jours. Les plantules fraîchement récoltées, privées de leurs radicules, sont introduites dans des béchers de 15 ml et alimentées avec une solution radioactive de 1,8 ml. Les pigments anthocyaniques sont extraits avec de l'acétone à 80 % d'après la méthode décrite dans la 1ère partie. Chaque extrait est repris avec 20 ml de CH_3OH , ClH 3 % pour doser la quantité de pigments formés par spectrophotométrie (525 m μ).

On isole ensuite le pigment C III par chromatographie sur couches de polymide puis sur papier. On détermine ensuite la concentration de la solution d'élution et procède au comptage de la radioactivité (tableau XXI).

Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (c.p.m. par unité de D.O. de pigment formé).

On voit nettement que l'incorporation de la phényl alanine est activée par la lumière : si l'on compare l'activité des pigments formés au cours de la phase claire et de la phase sombre, on constate que l'activité incorporée pendant la première période est approximativement trois à quatre fois plus importante que pendant la seconde. Or, la synthèse se poursuit à l'obscurité; la quantité globale de pigments formés à la fin de cette période est approximativement 1,5 fois la quantité synthétisée au cours de la phase claire. On peut penser dans ces conditions, que c'est surtout le processus de transformation de la phényl alanine en précurseur $\text{C}_6 = \text{C}_3$ qui dépend directement de l'influence de la lumière en dehors de l'activation de l'association $\text{C}_6 = \text{C}_3 + \text{C}_6$ (chaîne polyacétate).

Ce fait n'a rien d'étonnant; on sait, en effet, que la lumière favorise la biosynthèse des acides aminés aromatiques (13); on a montré récemment que cette action s'exerce aussi sur leur déamination (14).

Essai	D.0 de l'extrait (20 ml) dans $\text{CH}_3\text{OH-ClH } 30 \text{ } \%$ à $525 \text{ m } \mu$	D.0 (525 m μ) C III dans $2,5 \text{ ml } \text{CH}_3\text{OH-ClH } 3 \text{ } \%$	Activité C III en c.p.m.	Activité C III en c.p.m. /D.0	Activité C III calculée en c.p.m./D.0. en tenant compte de la synthèse endogène
1	3,18	0,40	644	1610	
2	3,10	0,73	6543	8963	9961
3	3,26	0,59	3691	6255	8148
4	2,06	0,45	5622	12500	

TABLEAU XXI

ACTIVITE DU PIGMENT C III D'APRES LE REGIME D'ECLAIREMENT

Les essais 2, 3 et 4 sont intéressants car ils montrent qu'une partie des pigments anthocyaniques formés pendant la phase claire est métabolisée au cours de la phase sombre. En effet, si l'on compare les essais 3 et 4, le calcul montre que l'activité de C III dans l'essai 3 devrait être égale à 8148 c.p.m./D.0; la valeur observée n'est que de 6255 c.p.m./D.0.

De même, dans l'essai 2, malgré une alimentation active continue pendant la phase sombre, le calcul indique une activité égale à 9961 c.p.m./D.0; la valeur observée n'est que de 8963 c.p.m./D.0.

En conclusion, le rendement en pigments ^{14}C est meilleur lorsque l'alimentation en phényl alanine radioactive est effectuée pendant la phase claire.

CHAPITRE III

INCORPORATION DE PRECURSEURS DIVERS DANS LES PIGMENTS DES PLANTULES DE SEIGLE ET DE CHOU

A. Rapport des activités propres au pigment C I et aux groupements acylés des pigments du chou.

A priori, si l'on admet que l'incorporation de la phényl alanine 3 - ^{14}C dans le cycle B des antocyanes se fait par l'intermédiaire de l'acide cinnamique ou de l'acide p.coumarique, nous pouvons penser que l'activité du cyanidol 2 - ^{14}C est identique ou légèrement inférieure à celle de l'acide hydroxycinnamique qui l'estérifie. En fait, nos expériences montrent que l'activité de C I est toujours plus importante que celle du groupement acylé qui l'estérifie.

1ère Expérience :

L'essai porte sur 40 plantules étiolées que l'on alimente pendant 2 jours avec une solution radioactive de phényl alanine 3 - ^{14}C (21,6 Ci pour 1,8 ml de solution de Moyse). Les plantules sont soumises à un éclairage cyclique pendant toute la durée de l'alimentation active. On isole et on purifie le pigment C III par la méthode décrite et on lui fait subir une hydrolyse alcaline avec Na OH 10 % sous azote pendant 3 heures. Les acides sont extraits à l'acétate d'isopropyle et soumis à chromatographie sur couche mince de cellulose (solvant J). Le pigment C I résiduel est ensuite hydrolysé en milieu acide 7,26 N; le cyanidol est extrait à l'alcool amylique tandis que la phase aqueuse qui contient le glucose est lyophilisée. Le comptage de ces différents éléments est résumé dans le tableau suivant :

	<u>Activités en c.p.m.</u>
C III	3059
cyanidol	1130
acide férulique	1813
glucose	45

Ces valeurs permettent d'établir le rapport des activités

$$\frac{\text{activité C I}}{\text{activité I férulique}} = 1,30.$$

A noter que les sucres ne sont pas radioactifs.

2ème Expérience :

L'essai est effectué sur 100 plantules de chou étiolées âgées de 8 jours que l'on alimente avec 1,8 ml de la solution de phényl alanine radioactive précédente. Les plantules sont soumises à un éclaircissement cyclique de 2 jours pendant la durée de l'alimentation. On isole le pigment C VI que l'on purifie successivement par chromatographie sur couches minces de polyamide et sur papier Whatman I. Après élution, on obtient 5 ml de pigment en solution dans CH_3OH 0,01 % ClH .

Après hydrolyse alcaline de ce dernier sous azote avec Na OH 10 %, on extrait l'acide p.coumarique à l'acétate d'isopropyle. L'acide est purifié par chromatographie sur papier (solvant benzène-acide acétique-eau 6 : 7 : 3 v/v), puis élué avec du méthanol. On procède ensuite au dosage spectrophométrique et au comptage. Le pigment C I résultant est purifié par chromatographie sur papier (H COOH 0,5 %) et élué avec le mélange H COOH 1 % - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1 : 1) v/v. On lyophilise, puis on reprend le résidu sec avec 3 ml de pigment C I non actif en solution dans CH_3OH 0,01 % ClH (D.O. = 0,74) jouant le rôle d'entraîneur. Après dosage du pigment C I par spectrophotométrie, on le soumet au comptage.

	Activité en c.p.m.	Quantités en moles	Activé spécifique / mole
C VI	1565		
Acide p.coumarique	174	$85 \cdot 10^{-9}$	$2,04 \cdot 10^9$
C I	98	$27 \cdot 10^{-9}$	$3,63 \cdot 10^9$

Le rapport des activités spécifiques $\frac{\text{Activité C I}}{\text{Activité I p.coumarique}}$ est voisin de 1,8.

Ces deux expériences montrent que l'incorporation de la phényl alanine est plus importante dans l'aglycone que dans la partie acylée. Il est donc vraisemblable que la formation de C_1 , qui incorpore le précurseur $\text{C}_6\text{-C}_3$, précède l'estérification par les acides hydroxycinnamiques des sucres qui lui sont rattachés.

Nous n'avons pas encore étudié la distribution de la radioactivité dans les carbones des cycles A et B; on pourrait penser qu'éventuellement une partie de l'activité de la phénylalanine ^{14}C est incorporée dans le noyau A ce qui contribuerait à accroître l'activité de l'aglycone : une dégradation de la phénylalanine avec coupure de la liaison $\text{C}=\text{C}$, noyau aromatique - $\text{C } \beta$ semble cependant très peu probable.

B. Incorporation du cyanidol 3 glucoside dans les pigments du seigle.

a) Formation des hétérosides phénoliques.

Nous avons isolé, à partir des plantules de seigle alimentées avec de la phényl alanine 3 - ^{14}C , du cyanidol 3 glucoside marqué sur l'aglycone qui nous a servi à vérifier le processus de la glycosidation dans les pigments anthocyaniques du seigle.

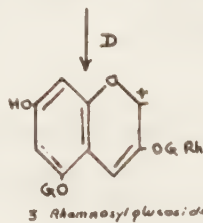
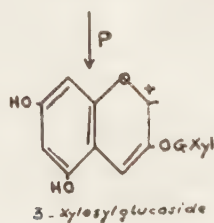
YAMAHA et CARDINI (15) ont montré que le transfert du glucose à l'hydroquinone et à divers phénols pouvait se faire in vitro en présence d'U.D.P.D. glucose (Uridine diphosphate D. glucose) et d'une préparation enzymatique obtenue à partir de germes de blé. Le premier hétéroside est un mono glucoside; ce dernier peut accepter à son tour une deuxième molécule de glucose pour former le diglucoside ou gentiobioside.

BARBER (16), (17), à la suite des travaux de WATKIN et NEISH (18), a étudié la biosynthèse in vitro de la rutine à partir du quercétol en présence d'U.D.P.D. glucose et d'une préparation enzymatique obtenue à partir de feuilles de *Phaseolus aureus*. La biosynthèse s'effectue en deux étapes avec formation tout d'abord de quercétol 3 glucoside puis fixation d'une molécule de L.rhamnose. Cette dernière réaction peut se faire par l'intermédiaire d'U.D.P.D. glucose, la préparation contenant un enzyme qui transforme l'U.D.P.D. glucose en U.D.P.L. rhamnose.

Bien que la preuve directe de glycosidation des anthocyanes n'ait pas été rapportée, il semble, d'après les études génétiques (19), que cette réaction se fait par étapes successives comme pour d'autres composés phénoliques.

Le schéma suivant emprunté à HARBORNE (19) montre que les étapes de la synthèse des hétérosides contrôlée par différents gènes dans *Streptocarpus* (Schéma 11).

Précurseur $\xrightarrow{Q}$ 3 glucoside $\xrightarrow{X,Z}$ 3 glucosido 5 glucoside



Q : glucose
Xyl : xylose
Rh : rhamnose
D, P, Q, X, Z : gènes

Schéma 11

Il est vraisemblable, comme le suggèrent HARBORNE et SHERRATT (20), que la glycosidation est une des réactions qui suit la cyclisation du précurseur.

Il était intéressant de contrôler in vivo la formation des di et triosides à partir d'un anthocyanoside simple, 3 monoglucoside. Dans ce but, nous avons fait absorber à des plantules de seigle, en présence de lumière, du cyanidol 3 glucoside marqué ^{14}C sur l'aglycone.

b) Isolement du cyanidol 3 glucoside marqué ^{14}C .

Nous avons fait absorber à 25g de plantules étiolées âgées de 7 jours, 1,62 mg de phényl alanine 3 - ^{14}C en solution dans 10 ml de liqueur nutritive de Moyse.

L'alimentation des plantules est effectuée en présence de lumière par éclairement cyclique (2 mn éclairement; 4 mn obscurité) pendant 24 heures. Les plantules sont ensuite soigneusement rincées à l'eau distillée, gelées et broyées en présence de 200 ml d'acétone à 80 % préalablement refroidie à -20°C .

L'extraction est poursuivie avec 200 ml d'éther éthylique comme pour les plantules non actives, selon la méthode déjà décrite. On obtient ainsi 2,2 ml de pigments anthocyaniques en solution dans le mélange eau-méthanol-acide chlorhydrique conc. (100 : 100 : 0,8) v/v.

On dépose la solution active sous forme de traînées sur feuilles de papier Whatman I et on développe avec CH_3COOH 15 %.

La bande active du pigment S I (cyanidol 3 monoglucoside) est ensuite éluee à l'aide du mélange H-COOH 1,5 % - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1 : 1) v/v. On évapore sous vide la solution précédente et l'on reprend le résidu sec avec 3 ml de CH_3OH 0,01 % ClH. Le cyanidol 3 glucoside obtenu a une activité spécifique de $2,20 \cdot 10^{10}$ c.p.m./mole. (D.O. = 0,97; activité = 1620 c.p.m/ml.)

c) Alimentation des plantules de seigle en cyanidol 3 glucoside marqué ^{14}C .

La solution précédente est à nouveau évaporée à sec et reprise avec 0,5 ml de solution nutritive de Moyse.

Ce mélange a servi à alimenter 60 plantules étiolées (2,16 g) âgées de 8 jours.

Dans cette expérience, nous avons forcé l'alimentation : la solution et les plantules contenues dans un bécher de 15 ml sont introduites dans un exsiccateur où l'on fait un vide partiel. Le rétablissement progressif de la pression normale à l'intérieur du récipient facilite la pénétration de la solution active dans les plantules. On expose ensuite la préparation à la lumière pendant 6 heures dans les conditions habituelles. Les plantules sont récoltées et extraites pour en isoler les pigments S I, S II, S III, en solution chacun dans 3 ml de CH_3OH 0,01 % ClH. Le dosage et le comptage donnent les résultats suivants :

Pigment	Activité en c.p.m.	D.O (2,5 ml CH_3OH -0,01 % ClH)	Activité spécifique/mole en cp.m/mole	Dilution
S I	90	0,865	$1,38 \cdot 10^9$	16
S II	93	0,270	$4,56 \cdot 10^9$	4,8
S III	162	0,485	$4,43 \cdot 10^9$	5

D.O de la solution globale (3 ml) de pigments = 0,975.

Pour contrôler l'incorporation du cyanidol 3 glucoside radioactif, nous avons traité, comme dans l'essai précédent, 2,04 g de plantules sur milieu non actif. Après extraction des pigments anthocyaniques, la solution dans le mélange eau-méthanol-acide chlorhydrique conc. 100 : 100 : 0,8 v/v a une D.O. de 0,625, ce qui permet d'établir le coefficient de dilution égal à 1,48.

La valeur de l'activité spécifique calculée pour S I est de :

$$\frac{2,20 \cdot 10^{10} \text{ c.p.m./mole}}{1,48} = 1,48 \cdot 10^{10} \text{ c.p.m./mole}$$
 tandis que la valeur observée est environ 10 fois plus faible.

L'incorporation dans les pigments S II et S III montre que la glycosidation de ces derniers peut être considérée comme consécutive à la formation du cyanidol 3 monoglucoside : la biosynthèse des hétérosides résulte donc de l'accrochage de nouvelles unités sucres au monoglucoside initial.

La dilution de l'activité spécifique dans les pigments S I, S II, S III s'explique par une biogénèse simultanée avec des vitesses différentes à partir d'un même précurseur. En fait, s'il s'agissait d'un processus en chaîne, les activités de S II et S III seraient plus diluées que celle de S I.

Il est donc logique de penser que la structure du précurseur est différente de la forme sel de flavylium de l'anthocyanoside : les dilutions de S I, S II, S III sont en effet supérieures à la dilution 1,48 calculée d'après les quantités de pigments formées dans les plantules des deux essais précédents.

C. Incorporation de cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside ^{14}C dans les pigments du chou.

Le problème de l'acylation est de même nature que celui de la glycosidation. La fixation de groupements acylés sur les molécules de sucres doit intervenir dans une des dernières étapes de la biosynthèse. Il semble vraisemblable que cette réaction soit le résultat d'une transacylation (21).

Nous avons voulu vérifier si les anthocyanosides sont des accepteurs pour cette réaction. Nous procédons de la manière suivante : des plantules de chou sont alimentées avec de la phényl alanine 3- ^{14}C pour marquer le cyanidol des pigments anthocyaniques. Après hydrolyse alcaline de ces derniers, on recueille C I marqué ^{14}C que l'on incorpore ensuite à d'autres plantules pour contrôler la réaction d'acylation.

Mode opératoire :

4,50 g de plantules de chou étiolées, âgées de 7 jours, réparties dans deux récipients, sont alimentées avec, dans chacun d'eux, 1,8 ml de solution nutritive de Moysse enrichie de phényl alanine 3- ^{14}C (48 μCi).

On isole, par la méthode déjà décrite, les pigments anthocyaniques auxquels ont fait subir une hydrolyse alcaline avec Na OH 10 %. Le pigment C I qui en résulte est purifié par chromatographie sur couche de cellulose avec le solvant $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{ClH}-\text{H}_2\text{O}$ (3 : 1 : 20 v/v).

On obtient ainsi 3 ml de solution méthanolique de pigment C I : D.0 = 2,63
 Activité = 3400 c.p.m - Activité spécifique = $1,71.10^{10}$ c.p.m/mole.

La solution précédente est évaporée sous vide, puis on dissout le résidu sec dans 1,8 ml de liqueur nutritive de Moyse. Cette solution sert à alimenter 50 plantules étiolées âgées de 8 jours (2,34 g), en présence de lumière; les plantules sont éclairées en continu pendant 4 jours.

On extrait les pigments anthocyaniques avec 70 ml d'acétone à 80 %; la solution obtenue est ensuite évaporée à sec sous vide. Le lavage répété du résidu sec avec 100 ml d'éther de pétrole permet d'en extraire les chlorophylles, les caroténoïdes et les lipides. Le mélange de pigments anthocyaniques obtenu est purifié par chromatographie sur couches minces de polyamide avec le solvant méthyl éthyl cétone-toluène-acide acétique - méthanol-eau (80 : 10 : 2 : 5 : 6) v/v. L'ensemble des pigments anthocyaniques migre peu et ne présente pas de séparation. On élue ensuite la bande unique des pigments colorée en rose avec le mélange HCOOH 1,5 % - C_2H_5OH 1 : 1 v/v. Après concentration de la solution par évaporation sous vide, on chromatographie le mélange obtenu sur deux feuilles de papier Whatman I pour séparer les pigments (solvant : n-butanol - acide chlorhydrique conc. - eau 7 : 2 : 5 v/v). Les pigments sont ensuite élués avec le mélange HCOOH 1,5 % - C_2H_5OH 1 : 1 v/v). On évapore les solutions résultantes à sec; chaque extrait est ensuite dissout dans 3 ml de mélange CH_3OH - 0,01 % ClH .

Les solutions obtenues sont dosées par spectrophotométrie et soumises au comptage. Les pigments n'ont incorporé qu'une fraction de la radioactivité du précurseur C I; la majeure partie a été dispersée dans d'autres substances de nature non identifiée. Le pigment C I actif élué correspond au cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside résiduel non incorporé auquel s'ajoute une petite quantité de pigment C I résultant d'une hydrolyse partielle des pigments acylés. Rappelons que le pigment $C I_2$ (C I + copigment) n'a pas été rencontré dans les plantules.

Pigment	Activité en c.p.m.	Activité spécifique en c.p.m./mole	Dilution apparente
C I élué	44	$2,1.10^9$	8
C I incorporé dans les pigments acylés (C III + C IX + C V + C VI)	32 2	$4,3.10^8$	40
Produit de dégradation	193		

Par suite de la synthèse endogène, l'activité initiale du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside est diluée 3,9 fois. L'activité spécifique calculée pour C I élué est égale à :

$$\frac{1,71.10^{10} \text{ c.p.m./mole}}{3,9} = 4,37.10^9 \text{ c.p.m./mole.}$$

L'activité observée étant de $2,1.10^9$ c.p.m/mole, la dilution réelle est en fait voisine de 2.

L'activité des pigments acylés est telle que l'activité du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside ^{14}C incorporé dans C III, C IX, C V, C VI est approximativement le 1/9 de l'activité totale apportée par le précurseur C I.

L'activité spécifique de C I incorporé dans les pigments acylés est de $4,30.10^8$ c.p.m/mole, soit une dilution égale à :

$$\frac{1,71.10 \text{ c.p.m/mole}}{4,30.10 \text{ c.p.m/mole}} = 40$$

par rapport à l'activité spécifique initiale du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside.

Si l'activité de C I incorporé est rapportée à $4,37.10^9$ c.p.m/mole, activité calculée d'après la synthèse endogène, la dilution est ramenée à 10. On peut donc penser, comme pour la glycosidation, que le cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside est transformé intermédiairement en un substrat de structure différente de la forme sel de flavylum, avant acylation consécutive.

La plus grande partie de l'activité initiale introduite par le précurseur C I se trouve dispersée dans d'autres substances que nous n'avons pas identifiées : l'une d'entre elles localisée chromatographiquement ($R_f = 0,72$ solvant 7 : 2 : 5) a incorporé à elle seule la moitié de l'activité contenue dans l'ensemble des pigments anthocyaniques élués.

Les anthocyanes, comme d'autres métabolites sont l'objet de transformations qui les rendent disponibles pour de nouvelles réactions.

Dans les plantules de chou rouge, il n'y a pas accumulation, mais renouvellement des pigments anthocyaniques, ce qui motive la permanence de la coloration rouge. Ceux-ci ne peuvent donc pas être considérés comme des " produits gratuits " et " terminaux du métabolisme des végétaux.

D. Incorporation de dihydroquercétol dans les plantules de chou.

Les travaux de BIRCH (22) et de GRISEBACH (23) ont permis de préciser les étapes de la biosynthèse des flavonoides et en particulier celle des anthocyanes.

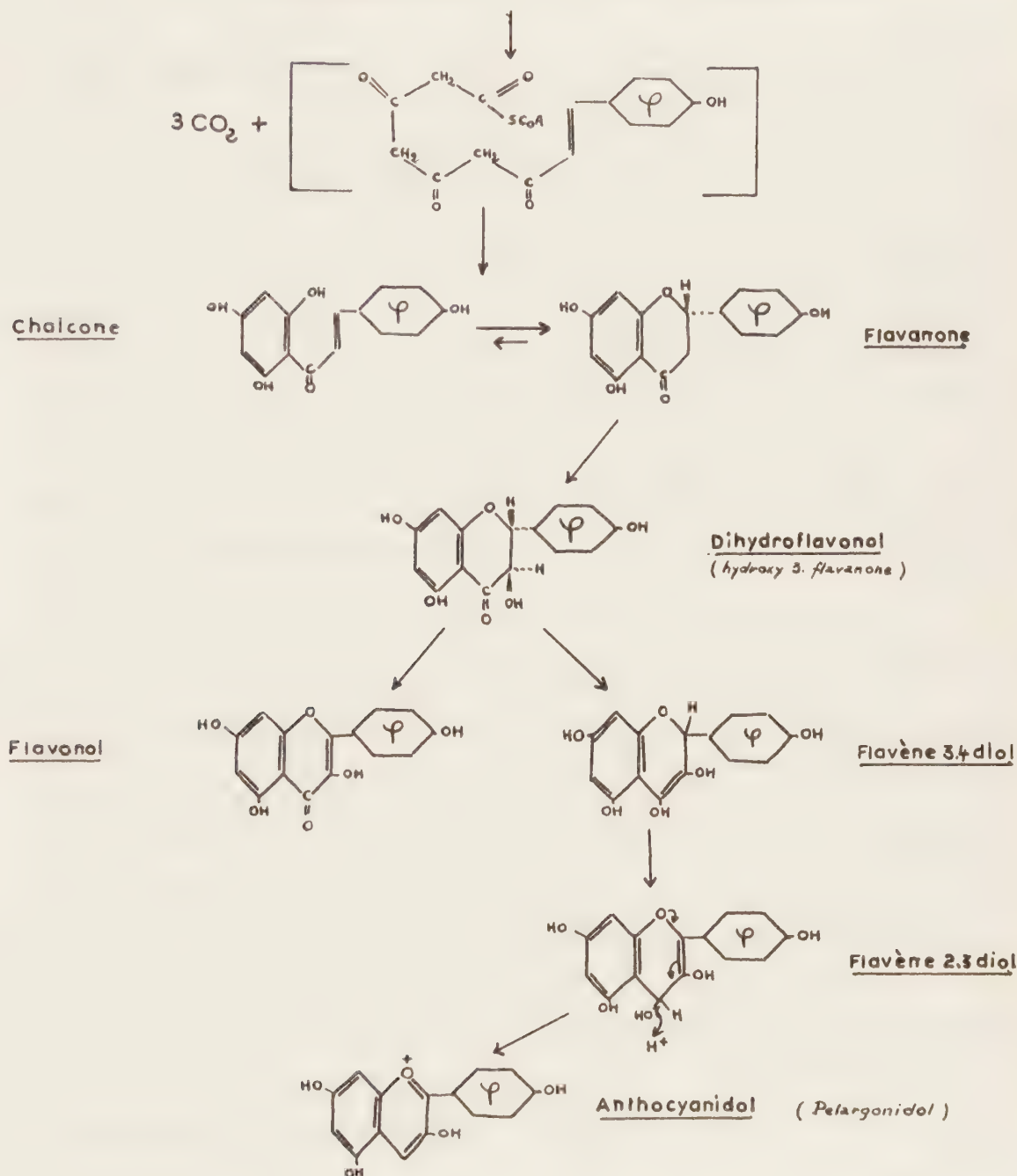
Bien que le schéma (tableau 22) donne une idée claire des processus biosynthétiques, GRISEBACH fait les réserves suivantes :

- le squelette en C_{15} des flavonoides résulte de la condensation d'une unité phényl-propane, incorporée intégralement, avec 3 unités acétate, ces dernières étant liées l'une à l'autre tête à queue pour former le cycle A.

- la nature du précurseur phényl propane n'est pas encore connue bien qu'il y ait une forte présomption en faveur des acides cinnamiques. Les acides phényl lactique et phényl pyruvique représentent des possibilités qui ne sont pas à rejeter.

- la formation d'un ester du CoA dérivé d'un acide cinnamique ou d'un acide en $\text{C}_6 - \text{C}_3$ n'a pu être encore démontrée dans les plantes supérieures.

Un mole de p.coumaroyl-SCoA + Trois moles de malonyl-SCoA



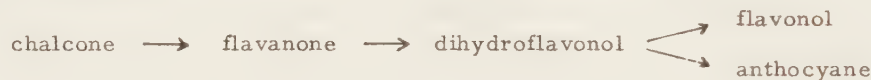
SCHEMA DE LA BIOSYNTHESE

TABEAU XXII

- de même la formation de malonyl CoA, qui pourrait être considéré comme précurseur du cycle A, par analogie avec la biosynthèse des acides gras, n'a pas été confirmée expérimentalement.

Ce ne sont là cependant que des problèmes d'importance secondaire qui ne compromettent en rien le schéma biosynthétique proposé par cet auteur.

On a pu douter un moment du rôle des chalcones en tant que précurseurs des flavonoides : GRISEBACH et coll. (24) ont en effet montré que ces substances peuvent être dégradées dans les plantes supérieures en acides cinnamiques et en d'autres substances non identifiées. Cependant, GRISEBACH et coll. (25) ont pu prouver récemment que la 5, 7, 4' trihydroxy flavanone s'incorporait intégralement dans le cyanidol des pigments des plantules de chou. Cette incorporation se fait par l'intermédiaire de la transformation des flavanones en 3 hydroxy flavanones. GRISEBACH et coll. (26) ont montré en effet que l'incorporation de la 4, 2', 4', 6' tétrahydroxychalcone 2' glucoside doublement marquée (β ^{14}C , β T) dans le dihydro kaempférol 3 xyloside des plantules de *Chaemocyparis obtusa* se fait sans dilution. L'incorporation des dihydro flavonols dans la biosynthèse des flavonols et des anthocyanes a été finalement confirmée par GRISEBACH et coll. (27). L'incorporation effective de dihydro kaempférol T dans le quercétol et le cyanidol des plantules de sarrazin les a conduits à proposer le schéma biosynthétique suivant :



Ces résultats nous ont incité à vérifier l'incorporation du dihydroquercétol (tétra hydroxy 5-7-3'-4' dihydro flavonol) dans la molécule de cyanidol du cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside des plantules du chou.

Un premier essai a été effectué par alimentation compétitive de plantules de chou étiolées avec un mélange de dihydroquercétol non actif et de phényl alanine 3- ^{14}C .

Dans un second essai comparatif, on a omis le dihydroquercétol; les plantules ne sont alimentées que par une solution de phényl alanine radioactive.

Dans le premier essai, on observe une dilution significative de la radioactivité incorporée par le cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside et en même temps un accroissement de la quantité de pigments formés.

Ces observations confirment les résultats de GRISEBACH et coll.. L'incorporation du dihydroquercétol dans la molécule de cyanidol est une preuve de plus en faveur du rôle fondamental joué par ces substances.

Mode opératoire :

180 plantules étiolées, âgées de 7 jours, réparties en deux lots égaux dans deux béciers de 15 ml sont alimentées respectivement avec :

- dans l'essai I : 1,8 ml d'une solution nutritive de Moyse enrichie de phényl alanine 3- ^{14}C (26 μ Ci) et complétée avec 5,3 mg (17,4 μ moles) de dihydroquercétol.

- dans l'essai 2 : 1,8 ml de la solution nutritive de Moyse contenant seulement de la phényl alanine 3 - ^{14}C (26 μCi).

Les deux lots de plantules sont exposés à un éclairage intermittent pendant 19 heures.

On extrait les pigments avec 70 ml d'acétone à 80 % et procède aux opérations d'isolement habituelles. On obtient ainsi deux extraits globaux de 50 ml dans le mélange méthanol-eau-acide chlorhydrique (100 : 100 : 0,8 v/v).

Les pigments anthocyaniques sont purifiés par chromatographie sur couches minces de polyamide et dosés par spectrophotométrie dans le méthanol -Cl H 3 %. Après évaporation à sec de la solution précédente, les pigments sont hydrolysés avec 0,5 ml de Na OH 10 %. La saponification permet de recueillir le pigment C I que l'on purifie finalement par chromatographie sur couche mince de cellulose (solvant : acide acétique-acide chlorhydrique conc. -eau(3 : 1:20)v/v).

Après élution et concentration, les pigments CI des essais 1 et 2 sont repris avec 3 ml de CH_3OH -0,01 % ClH avant d'être dosés et comptés.

Nous avons rassemblé ci-dessous l'ensemble des résultats de cette expérience :

Essais	Poids des plantules	D.O. Solution de pigments	D.O. C I	Activité c.p.m.	Activité spécifique c.p.m/mole	Dilution
1	4,07	1,55	1,95	5269	$3,58 \cdot 10^{10}$	50
2	3,64	1,18	2,00	7024	$4,67 \cdot 10^{10}$	38

Dans l'essai 1, la dilution de C I par rapport à l'activité spécifique de la phényl alanine utilisée est 1,31 fois plus importante que la dilution observée dans l'essai 2.

Il est hors de doute que cette dilution est due à l'incorporation du dihydroquercétol dans le cyanidol des pigments.

CHAPITRE IV

ESSAI DE BIOSYNTHESE DES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES IN VITRO

L'isolement des systèmes enzymatiques responsables des transformations biochimiques in vivo représente l'étape la plus délicate mais aussi la plus féconde pour l'interprétation des réactions qu'elles contrôlent.

Dans le domaine plus particulier aux substances phénoliques, diverses préparations enzymatiques ont permis de mettre en évidence certaines transformations fondamentales. Ainsi, pour ne citer que quelques unes des réactions étudiées au cours de ces dernières années, signalons la déamination de la phényl alanine (27), de la tyrosine (28) et de la dihydroxyphénylalanine (29) en acides cinnamiques correspondants et la biosynthèse de la rutine par transglycosidation du quercétol à partir d' U.D.P.D. glucose (16) (17).

Nous nous sommes proposés de montrer dans une première étude qu'il était possible d'envisager la biosynthèse des pigments anthocyaniques en dehors des organismes vivants. Nous avons tout d'abord récolté des plantules de chou dont la croissance s'est effectuée pendant 4 jours en présence de lumière. Puis, nous avons observé qu'après broyage, dans un milieu de Knopp enrichi d'oligo-éléments, sous l'action de l'air et de la lumière, ces mêmes plantules étaient capables de continuer à synthétiser les pigments anthocyaniques.

Toutefois, à poids égal, la synthèse dans les broyats est réduite par rapport à la synthèse dans les plantules; c'est pourquoi, il était intéressant de la contrôler avec un précurseur radioactif.

Nous avons préparé à partir des plantules de chou, éclairées pendant 4 jours, une poudre acétonique que nous avons mise en suspension dans une solution tampon contenant les éléments suivants : un extrait acétonique de plantules étiolées développées à l'obscurité, divers cofacteurs (ATP, NADPH, Cl_2Mg , CoA) et de la phényl alanine radioactive.

La préparation est éclairée pendant 24 heures à 20° C. Les pigments sont ensuite isolés et soumis au comptage.

Mode opératoire :1) Préparation de la poudre acétonique.

On récolte 40 g de plantules de chou étiolées développées 7 jours à l'obscurité complète et exposées pendant 4 jours à l'action de la lumière fluorescente intermittente. Les plantules sont immédiatement broyées à l'homogénéiseur pendant 2 minutes en présence de 150 ml d'acétone à 80 %, refroidie à -20° C. On filtre sur buchner et rince 3 fois avec l'acétone refroidie. Après essorage du broyat par succion sur la fiole à filtrer, on le soumet à une dessiccation sous vide pendant 3 heures à 15° C.

Nous avons obtenu 3,90 g. de poudre acétonique sèche que l'on conserve au réfrigérateur à 5 - 6° C.

2) Préparation du milieu réactionnel.

On prépare séparément :

- une solution (A) de phényl alanine radioactive : 0,30 mg de phényl alanine $3 - {}^{14}\text{C}$ (22 μCi) sont dissous dans 0,5 ml de tampon " Tris " (tris hydroxyméthyl amino méthane) 0,05 M amené à pH 7,6 avec ClH conc.

- une solution (B) de cofacteurs :

A T P : 1,11 mg (2 μmoles).

N A D P H : 0,65 mg (2 μmoles).

CoA : 1,55 mg (2 μmoles).

$\text{Cl}_2\text{Mg}, 6 \text{H}_2\text{O}$: 1,00 mg (5 μmoles) en solution dans 1 ml de tampon " Tris " pH 7,6.

- une suspension (C) de poudre acétonique : on dissout 0,039 g d'extrait acétonique global provenant de 4 g de plantules étiolées âgées de 8 jours dans 4 ml de tampon " Tris " , pH 7,6. On ajoute à cette solution 0,216 g de poudre acétonique.

A noter que les plantules étiolées utilisées pour la préparation de l'extrait acétonique se sont développées à l'obscurité.

Dans une fiole conique de 10 ml, on mélange :

0, 5 ml de solution (A).

0, 3 ml de solution (B).

2 ml de suspension (C).

La préparation est ensuite exposée pendant 24 heures à l'air et à la lumière à température constante de 20°C.

3) Extraction des pigments.

Le mélange réactionnel est extrait selon la méthode habituelle avec 70 ml d'acétone à 80 %. Les pigments sont purifiés par chromatographie sur polyamide avec le solvant méthyl éthyl cétone-toluène-acide acétique-méthanol-eau (80 : 10 : 2 : 5:6)v/v . La séparation est effectuée par chromatographie sur papier (solvant : n butanol-acide chlorhydrique conc.-eau 7 : 2 : 5 v/v). On élue les pigments C III et C IX; on détermine l'activité du pigment C I qu'ils contiennent :

- activité C I en solution dans 3 ml de $\text{CH}_3\text{OH}-\text{ClH}$ 0,01 % = 722 c.p.m.

- D.O de la solution : 1,09.

- activité spécifique : $8,76.10^9$ c.p.m/mole.

- dilution : 200 (par rapport à l'activité spécifique de la phényl alanine utilisée).

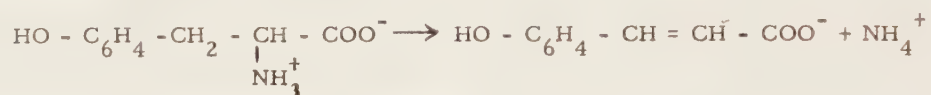
L'acide férulique est actif et présente une activité de 347 c.p.m soit une dilution de l'ordre de 400.

CHAPITRE V

TRANSFORMATION DE LA TYROSINE EN ACIDE P.COUMARIQUE

Nous ne sommes pas parvenu à mettre en évidence in vitro la biosynthèse des anthocyanes du seigle en présence de poudre acétonique et de phényl alanine $3-^{14}\text{C}$ ou de tyrosine $1-^{14}\text{C}$.

Accessoirement, l'étude de la réaction nous a permis de mettre en évidence l'existence d'une déaminase qui présente une sélectivité élevée pour la transformation de la tyrosine en acide p.coumarique.



Cet enzyme existe dans le seigle comme dans d'autres Graminées (blé, orge, avoine, riz, alfa, canne à sucre, maïs, sorgho) étudiées par NEISH (28).

L'enzyme est présent dans les jeunes plantules aussi bien que dans les tiges des plantes au moment de l'épiaison.

C'est à partir des tiges de seigle et à ce stade de croissance que nous avons préparé la poudre acétonique qui nous a servi à transformer la tyrosine radioactive en acide p.coumarique radioactif.

Parallèlement, nous avons fait un essai identique en présence de phényl alanine également radioactive; dans ce cas, la quantité d'acide p.coumarique formée est peu importante, ce qui montre la sélectivité de la réaction. Celle-ci représente peut être l'étape intermédiaire qui conduit de l'acide aminé à l'unité phényl propane $\text{C}_6 - \text{C}_3$ qu'incorporent les flavonoides.

Mode opératoire :

Nous avons procédé selon la méthode de NEISH (28). Le seigle semé à l'automne a été récolté au printemps suivant au moment de l'épiaison. Seules les tiges et les feuilles ont été utilisées dans notre préparation.

Dans ces conditions, nous avons obtenu 62 g de poudre acétonique à partir de 800 g de matériau frais.

- Préparation des mélanges réactionnels.

On prépare tout d'abord une suspension de 0,672 g de poudre acétonique dans 15 ml de tampon " Tris " 0,05 M ajusté à pH 8,65 avec ClH conc. Le mélange est distribué dans trois tubes à essai à volumes égaux :

a) dans le premier tube, destiné à l'essai avec la tyrosine, on ajoute :



FIG. 24 : CHROMATOGRAPHIE ET AUTORADIOGRAMME (T) DE
L'ACIDE p. COUMARIQUE ^{14}C OBTENU PAR DEAMINA-
TION DE LA L. THYROSINE ^{14}C .

Papier Whatman I

Solvant : benzène-acide acétique-eau (6:7:3) v/v.

- 1,45 mg de L.tyrosine non active,
- 0,1 ml d'une solution aqueuse de L.tyrosine uniformément marquée ^{14}C (10 μCi) d'activité spécifique égale à 113 m Ci/millimole,
- 2,9 ml d'eau distillée.

b) dans le second, destiné à l'essai avec la phényl alanine, on ajoute :

- 2,20 mg de phényl alanine non active,
- 0,32 mg de phényl alanine $3\text{-}^{14}\text{C}$ (23 μCi) soit un peu plus du double de l'activité de la tyrosine utilisée dans le premier essai),
- 3 ml d'eau distillée.

c) dans le troisième tube, utilisé comme témoin, on ajoute simplement 3 ml d'eau distillée.

Les trois tubes sont ensuite bouchés et introduits dans un bain thermostaté où ils sont maintenus 4 heures à 40° C.

- Extraction et isolement de l'acide p.coumarique.

Après incubation, les trois tubes sont traités de manière identique. On ajoute aux mélanges réactionnels 10 ml d'eau puis 0,6 ml de $\text{ClH } 7,26 \text{ N}$.

Après centrifugation de la suspension, le surnageant est extrait avec 40 ml d'acétate d'isopropyle.

Le culot est lavé avec 10 ml d'acétate d'isopropyle puis on rassemble les extraits.

Après évaporation à sec de la solution, le résidu est dissous dans 5 ml de $\text{CO}_3\text{H Na } 5\%$ aqueux. Cette dernière solution est lavée à l'acétate d'isopropyle puis à l'éther éthylique.

On décante la phase aqueuse et l'acidifie avec 0,6 ml de $\text{ClH } 7,26 \text{ N}$ puis on extrait les acides libérés avec 15 ml d'acétate d'isopropyle. Le solvant est éliminé par évaporation sous vide et le résidu sec est finalement dissous dans 0,1 ml de CH_3OH . 40 μl de mélange sont déposés sur papier Whatman I et le développement est effectué avec le solvant benzène-acide acétique-eau (6 : 7 : 3) v/v.

Chromatographie et autoradiogramme (Fig.24) montrent nettement la présence d'acide p.coumarique radioactif dans l'essai en présence de tyrosine. Le faible noircissement à hauteur de l'acide p.coumarique, dans le cas de l'essai avec de la phényl alanine radioactive, ne permet pas de conclure nettement à la transformation de cette dernière en acide p.coumarique.

Dans ces conditions expérimentales, la dilution de l'activité spécifique de l'acide p.coumarique par rapport à celle de la tyrosine est de 1,1.

La Fig.25 représente les enregistrements des chromatogrammes concernant les essais précédents.

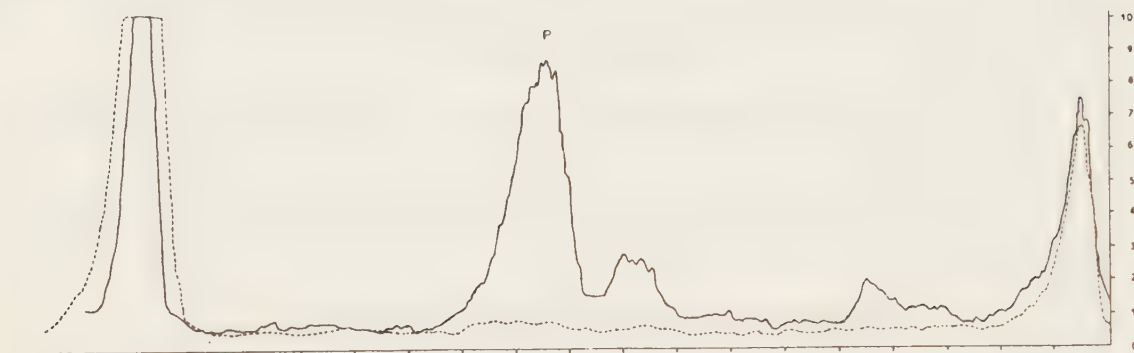


FIG. 25 : Enregistrement des radiochromatogrammes correspondant à la séparation de l'acide p. coumarique ^{14}C obtenu par transformation enzymatique de la L. tyrosine ^{14}C (—) et de la phényl alanine ^{14}C (---).

P : Emplacement de la tache radioactive d'acide p. coumarique.

Papier Whatman I

Solvant : 6 : 7 : 3

Enregistreur : Actigraph II - Nuclear Chicago

Puisque la tyrosine, dans les plantules de seigle, se transforme en acide p.coumarique, il reste à mettre en évidence le rôle intermédiaire de cette réaction dans la biosynthèse du cyanidol.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

IVème PARTIE

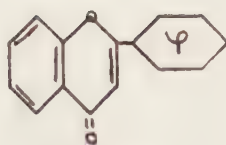
- 1 Siegelman H.W. et Hendricks S.B., *Plant Physiol.* (1957) 32, 393.
- 2 Mohr H., *Planta* (1957) 49, 389.
- 3 Borthwick H.A., Hendricks S.B. et Parker M.W., *Bot. Gaz.* (1951) 113, 95.
- 4 Butler W.L., Hendricks S.B. et Siegelman H.W. dans " *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* " p.197 Ed. Goodwin T.W., Academic Press (1965).
- 5 Siegelman H.W. et Hendricks S.B., *Plant Physiol.* (1958) 33, 185.
- 6 Downs R.J. et Siegelman H.W., *Plant Physiol.* (1963), 38, 25.
- 7 Mohr H. et Van Nes E., *Z. Bot.* (1963) 51, 1.
- 8 Brégeaut et Rollin P. dans Rollin P., *Année Biologique* (1964) III, 95.
- 9 Harraschain H. et Mohr H., *Z. Bot.* (1963) 51, 277.
- 10 Kandeler R., *Ber. dtsch. bot. Ges.*, (1958), 71, 34.
- 11 Mohr H., *Ann. Review of Plant Physiol.* (1962) 13, 465.
- 12 Bopp M., *Planta* (1957) 48, 631.
- 13 Moyse A., Colloque International du CNRS sur les Principes Immédiats tirés des algues (1961) p.81.
- 14 Zucker M., *Plant Physiol.* (1965) 40, 779.
- 15 Yamaha T., Cardini C., *Arch. Biochem. Biophys.* (1960) 86, 127, 133.
- 16 Barber G.A., *Biochemistry* (1962) 1, 463.
- 17 Barber G.A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1962) 8, 204.
- 18 Watkin J.E. et Neish A.C., *Phytochem.* (1961) 1, 52.
- 19 Harborne J.B. dans " *The Chemistry of Flavonoid Compounds* " (1962) p.593 Ed. Geissman T.A. Pergamon Press.
- 20 Harborne J.B. et Sherratt H.S., *Experientia* (1957) 13, 486.
- 21 Korkes S., Del Campillo A., Korey S.R., Stern J.R., Nachmansohn D., et Ochoa S., *J. Biol. Chem.* (1952) 198, 215.
- 22 Birch A.J., dans " *Chemical Plant Taxonomy* " (1963) p.141. Ed. Swain T. Academic Press.
- 23 Grisebach H. dans " *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* " (1964) p.223, Ed. Goodwin T.W. Academic Press.
- 24 Patschke L., Hess D. et Grisebach H., *Z.Naturforschg.* (1964) 19 b, 1114.
- 25 Patschke L., Barz W. et Grisebach H., *Z.Naturforschg.*(1964) 19 b, 1110.
- 26 Grisebach H., Barz W., Hahlbrock K., Kellner S. et Patschke L. Communication Federation European Biochemical Societies Vienne 1965.
- 27 Barz W., Patschke L. et Grisebach H., *Chem. Comm.* (1965) 17, 400.
- 28 Koukol J. et Conn E.E., *J. Biol. Chem.* (1961) 236, 2692.
- 29 Neish A.C., *Phytochem.* , (1961) 1, 1.
- 30 Macleod N.J. et Pridham J.B., *Biochem. J.* (1963) 88, 45 p.

Nomenclature flavonique



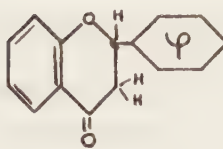
Flavane

Phényl 2. chromane



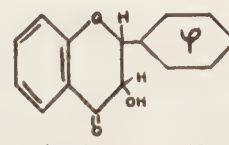
Flavone

Phényl 2. chromane



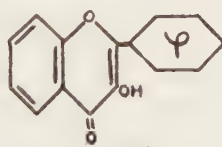
Flavanone

Dihydro 2.5 flavone



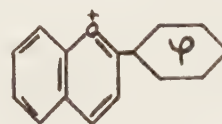
Dihydro 2-3 flavonol

ou Flavanonol ou hydroxy 3 flavanone



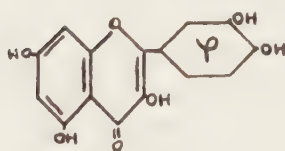
Flavonol

Hydroxy 3 flavone



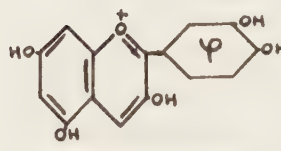
Flavylium

Phényl 2. benzopyrylium



Quercetol

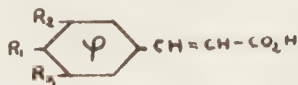
Tetra hydroxy 5-7-3'-4' flavonol



Anthocyanidol

*Pentahydroxy 5-5'-3'-4' phényl 2. benzopyrylium
ou Cyanidol*

Acides cinnamiques



Acide cinnamique : $R_1, R_2, R_3 = H$

Acide sinapique : $R_1 = OH; R_2, R_3 = OCH_3$

Acide p. coumarique : $R_1 = OH; R_2, R_3 = H$

Acide caféique : $R_1, R_2 = OH; R_3 = H$

Acide férulique : $R_1 = OH; R_2 = OCH_3; R_3 = H$

Acide diméthoxycinnamique : $R_1 = OH; R_2, R_3 = OCH_3$

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

Les pigments anthocyaniques sont des constituants universels des tiges, feuilles et fleurs des végétaux supérieurs, et leur structure les apparente à un autre groupe de constituants des plantes, les tanins, dont l'importance en Chimie Végétale s'accroît.

Or, des techniques récentes, telles que la chromatographie sous ses diverses formes et l'emploi des traceurs, permettent d'aborder avec fruit, à l'aide de méthodes microchimiques, des problèmes que posent en particulier les substances naturelles et notamment les pigments anthocyaniques; l'intérêt de ces études est garanti par le nombre de publications qui leur sont aujourd'hui consacrées.

Les travaux sur les anthocyanes représentent un secteur seulement des recherches engagées dans l'étude générale des flavonoïdes. Le tableau hors texte qui précède donne les relations de structure; la numérotation des atomes de carbone des chaînes y est indiquée suivant la convention généralement admise aujourd'hui; on peut ainsi traduire en structures explicites les termes employés pour désigner les espèces rencontrées dans le présent travail.

Les structures anthocyanes dérivent du noyau fondamental flavane ou phényl 2-chromane, d'où on passe théoriquement par oxydation à la flavone, et la réduction partielle de cette dernière conduit à la flavanone.

Parmi les hydroxyflavones, les hydroxy 3 = représentent les flavonols, dont les dérivés hydroxylés en 5 - 7 - 3' - 4' - 5' sont des flavonols naturels importants, exemple le quercétol.

Par fixation de 2 H sur un flavonol, on passe au dihydroflavonol ou flavanonol. Ce passage aux dihydroflavonols peut se faire aussi par oxydation des flavanones.

Les dihydroflavonols sont transformés en anthocyanidols par transposition suivie de déshydratation en milieu acide. La transposition du dihydroquercétol, suivie d'une déshydratation en milieu acide, fournit du cyanidol, pentahydroxy 3 - 5 - 7 - 3' - 4' phényl 2- benzopyrylium.

L'hémiacétalisation des fonctions hydroxyles, notamment en 3 - 5 - 7, avec différentes molécules d'oses, fournit des hétérosides, anthocyanosides ou anthocyanines; les oses rencontrés sont par ordre de fréquence décroissante : glucose, galactose, rhamnose, xylose, arabinose. Nous avons qualifié ces hétérosides de glycosides, lorsque nous ne préjugions en rien de la nature du sucre, réservant le terme de glucoside à ceux qui renferment spécialement du glucose associé à l'aglycone.

En outre, la mise en évidence du rôle des flavanones et des dihydroflavonols dans la biogénèse des flavonoïdes est une sérieuse acquisition récente dans la biochimie des pigments anthocyaniques. Le Tableau 22 indique l'affiliation.

Le but de notre travail consistait en l'analyse structurale des pigments anthocyaniques de végétaux à feuilles et tiges colorées et leur biogénèse. Nous avons choisi

si les plantules de seigle et du chou rouge sur lesquelles nous avons procédé à des extractions et purifications pour isolement, identification et détermination de structure.

Les pigments que nous avons isolés à partir des plantules de seigle, sont des glycosides dont l'aglycone est le cyanidol; par contre, dans le chou, les glycosides du cyanidol identifiés portent également des groupes acylés qui estérifient un ou deux hydroxyles du sucre, l'acide estérifiant étant l'acide p.hydroxycinnamique (ou acide p.coumarique), ou son dérivé méthoxylé, l'acide férulique.

Nous avons en outre pu mettre au point une méthode de synthèse partielle, in vitro, des pigments anthocyaniques à partir des flavonols glucosides de structure correspondante; la biogénèse et le rôle de l'irradiation en lumière blanche ont été également étudiés par emploi in vivo de carbone marqué ^{14}C .

Nous présentons notre travail en quatre parties.

- 1ère partie : Adaptation des méthodes et techniques.
- 2ème partie : Isolement, identification et structure des pigments anthocyaniques du seigle et du chou rouge.
- 3ème partie : Préparation des pigments anthocyaniques à partir des flavonols.
- 4ème partie : Essais sur la biogénèse des pigments anthocyaniques du seigle et du chou rouge.

Dans la première partie, nous décrivons les différentes techniques que nous avons utilisées : culture des plantules, séparations par chromatographie et électrophorèse, emploi de traceur radiochimique.

Nous insistons plus particulièrement sur les modifications et les améliorations que nous avons apportées aux méthodes, rappelant les avantages de la préparation des couches minces par pulvérisation. L'avancement du travail a largement bénéficié de la mise en œuvre d'une technique originale de confection de couches préparatives épaisses, avec des moyens commodes, très peu onéreux; nous avons alors pu employer, pour chaque opération d'isolement, jusqu'à 50 plaques simultanément, ce qui conduit à la préparation de quelques mg de produit pur; en outre, nous sommes à même de renouveler les opérations de nombreuses fois sans avoir à y consacrer un temps excessif et sans dépense abusive. De même, nous montrons l'avantage que présente l'utilisation de chromatoplaques de grandes dimensions, dans le cas de séparations chromatographiques difficiles.

Pour réduire la durée totale des éluions dans la chromatographie préparative sur papier, nous avons adopté un mode opératoire très simple, qui consiste à grouper une trentaine ou plus de bandelettes de papier qui ne portent chacune qu'une traînée définie; l'association se fait transversalement par piquage à la machine à coudre, l'ensemble est élué en bloc selon la méthode habituelle utilisée pour une chromatographie descendante.

Les conditions d'adaptation des couches minces à la photodensitométrie sont soumises à une étude critique : la reproductibilité des résultats dépend à la fois de la nature du support et de l'épaisseur des couches.

Nous apportons toutes précisions utiles dans la mise en œuvre de l'électro-

phorèse sur couches minces pour la séparation d'acides phénols et de pigments anthocyaniques.

Nous décrivons brièvement les techniques radiochimiques en insistant toutefois sur les conditions de préparation des autoradiogrammes.

La deuxième partie est consacrée au fractionnement des pigments anthocyaniques des plantules de seigle et du chou rouge par chromatographie sur papier et sur couches épaisses de cellulose et de polyamide.

L'isolement de chaque pigment exige plusieurs opérations de fractionnement et des purifications répétées, surtout dans le cas des pigments du chou. Deux solvants de développement sont très employés : CH_3COOH aqueux à 15 % pour les pigments du seigle; n.butanol - ClH concentré - eau, (7 : 2 : 5) v/v, pour les pigments du chou. Le solvant CH_3COOH - ClH concentré - H_2O , (3 : 1 : 20) v/v, que nous avons mis au point, s'est révélé excellent pour les séparations sur couches de cellulose. Cependant, ce n'est là que les principaux; plusieurs solvants agissant successivement, sont en effet nécessaires pour obtenir une purification satisfaisante.

Ces conditions nous ont permis d'isoler 3 pigments des plantules de seigle (S I ; S II ; S III) et 5 pigments des feuilles du chou rouge à maturité (C I₂ ; C III ; C IX ; C V ; C VI).

L'analyse des anthocyanosides comporte la détermination de l'aglycone et des sucres qui y sont fixés. Les éléments de structure sont libérés par hydrolyse acide des pigments; et les produits obtenus isolés et caractérisés grâce à des techniques chromatographiques sur papier et sur couches minces, comportant comparaison avec des témoins. Leur identification tient compte à la fois de la détermination des R_f et de la nature des colorations développées sous l'effet de réactifs chromogéniques appropriés.

Les aglycones et les sucres sont dosés par spectrophotométrie d'absorption dans le visible : la détermination du cyanidol, aglycone qui s'est révélée commune à tous les pigments étudiés, a été effectuée en solution dans l'alcool amylique. Les sucres (glucose, rhamnose) se combinent à l'acide p.amino benzoïque et cette combinaison sert de base à leur dosage et à l'évaluation du rapport molaire : aglycone/sucres.

La nature des substitutions osidiques dépend du rapport des extinctions pour 2 longueurs d'onde :

$$\frac{E_{440 \text{ m}\mu}}{E_{\text{max, absorption Visible}}}$$

La méthode de HARBORNE permet ainsi de distinguer les substitutions en 3 et en 3 - 5 sur l'aglycone.

La fragmentation des anthocyanosides, par hydrolyse acide contrôlée, fournit des hétérosides plus simples dont l'identification est la première étape de l'établissement de la structure du pigment complexe initial. Nous avons attiré l'attention à ce sujet sur la coupure plus facile des liaisons 5 osidiques dans le cas des 3 - 5 diglycosides,

lorsque l'hydrolyse acide est menée dans l'acide acétique à 10 % et à chaud. L'oxydation des pigments par H_2O_2 ou MnO_4^- K selon les méthodes de CHANDLER et HARPER, ou encore l'utilisation de rhamnodiastase pour les rutinoides, facilitent la détermination des groupements osidiques fixés en 3 sur l'aglycone.

Ces méthodes appliquées aux anthocyanosides du seigle ont permis d'attribuer aux pigments S I, S II, S III, les structures :

- S I - cyanidol 3 glucoside
- S II - cyanidol 3 rhamnoglucoside
- S III - cyanidol 3 rhamnodiglucoside (ou peut-être cyanidol 7 rhamnosido 3 diglucoside.

Le cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside (C I) est l'anthocyanoside commun à tous les pigments du chou rouge, que nous avons isolés. C III, C IX, C V, et C VI contiennent en outre des substituants acylés; C I₂ ne paraît pas porter de telles substitutions mais semble associé à un co-pigment de nature non identifiée.

La détermination de la structure de C I, en accord avec les travaux de HARBORNE, découle de l'application des méthodes déjà employées pour le seigle.

L'étude des pigments acylés du chou comporte en plus de la détermination de l'anthocyanoside (C I), l'identification des acides phénols engagés dans les groupements esters et leur dosage par spectrophotométrie. Après saponification des pigments, les acides phénols sont obtenus par chromatographie sur papier et sur couches minces de cellulose de grandes dimensions. L'électrophorèse sur papier s'avère très adaptée pour les acides hydroxycinnamiques et leurs stéréoisomères.

Cette étude nous conduit à assigner aux pigments du chou à maturité les constituants suivants :

- C I₂ - cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside + copigment de nature identifiée.
- C III - cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside + 2 groupements féruloyl.
- C IX - cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside + 2 groupements féruloyl.
- C V - cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside + 1 groupement féruloyl.
- C VI - cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside + 1 groupement p.coumaroyl.

Les pigments C III, C V et C VI avaient été identifiés par HARBORNE; les pigments C I₂ et C IX sont nouveaux.

Le pigment C I₂ se rencontre surtout dans les feuilles de chou à maturité; il est absent des plantules. C III est le plus abondant dans les feuilles à développement complet et C IX est le pigment principal des plantules de chou.

C III a fait l'objet d'une étude plus approfondie pour préciser la position des groupements esters dans la molécule. Cette étude est basée sur l'arrachement sélectif de la molécule de sucre fixée en 5, par hydrolyse acétique, et sur les résultats de la méthylation par l'iodure de méthyle en présence d'hydrure de lithium.

Le pigment C III est ainsi identifié au :

cyanidol 5 glucosido 3 (féruoyl 6 glucosidyl) I $\longrightarrow$ 2 (féruoyl 6 glucoside).

Les pigments isolés renferment comme acides estérifiants soit l'acide féru-
lique, soit l'acide p.coumarique, cependant les extraits bruts contiennent en outre des es-
ters de l'acide sinapique, d'autre origine, et dont les produits de saponification viennent
souiller les dérivés des pigments eux-mêmes et gêner leur purification.

Nous avons donc été amenés à examiner à part la dégradation de l'acide
sinapique-cis en milieu alcalin (pH = 8,3) et en milieu acide (pH < 2).

La transformation s'effectue avec formation d'un intermédiaire instable que
nous avons désigné par " Acide X ", dont les caractéristiques chromatographiques et spec-
trales ont été précisées.

L'acide X se polymérise facilement; cette difficulté nous a contraint à nous
limiter, pour le moment, à une étude partielle par spectrographie I.R., sur la nature du
produit de transformation. L'existence de fonctions esters ou lactones dans le polymère sug-
gère l'intervention d'un processus de polymérisation avec décarboxylation partielle, dans la
transformation de l'Acide X. Nous avons toutes raisons de penser que cet acide est un dimè-
re de l'acide sinapique. L'étude de la polymérisation se poursuit actuellement.

Ont été établis les spectres I.R. des pigments S I, S II, C I et d'un échantil-
lon commercial de malvidol 3 - 5 diglucoside pris comme témoin. Le pigment dispersé avec
du K Br solide est comprimé pour l'amener sous forme d'une pastille transparente. Tous les
spectres I.R. révèlent la présence de la bande de vibration 1637 cm^{-1} attribuée à la double
liaison de l'hétérocycle, conjuguée avec le noyau aromatique. La bande 1405 cm^{-1} ne se ren-
contre que dans les hétérosides dérivés du cyanidol. Ces deux bandes existent également
dans les produits de transformation des pigments par photolyse - (travail en préparation). De
plus, comme cela a déjà été signalé par RIBEREAU-GAYON, la bande 150 cm^{-1} du glucose
est absente des hétérosides étudiés.

Les pigments acylés C III et C IX sont caractérisés par l'existence d'une
bande à 1705 cm^{-1} propre aux esters $\alpha - \beta$ non saturés.

La séparation des pigments anthocyaniques par électrophorèse sur couches
minces de cellulose a été exécutée et a confirmé les possibilités de la méthode en tant que
technique analytique. Les résultats montrent que la mobilité des pigments croît avec le nom-
bre de molécules de sucres qu'ils contiennent. D'une manière générale, les pigments dont la
mobilité est la plus grande en électrophorèse ont les Rf les plus bas en chromatographie,
dans les solvants à base de butanol.

La troisième partie concerne une méthode originale de préparation des antho-
cyanosides à partir des flavonols, par réduction électrolytique dans un milieu peu acide,
pH = 2,15 (SO_4H_2 2,5 % - H COOH 2%, 1 : 1 v/v) solvant A. -

Nous avons adopté comme matière première la Rutine, produit commercial,
et ainsi transformé ce quercétol 3 rhamno glucoside en cyanidol 3 rhamno glucoside, avec un
rendement de l'ordre de 70 %. La réaction est générale et permet de préparer les pigments

anthocyaniques à partir des flavonols glycosides correspondants; elle offre l'avantage d'opérations unitaires sur des quantités de l'ordre du milligramme.

La réaction s'effectue avec formation de deux produits de réduction (I) et (II). (I) n'est pas oxydable, mais subit une déshydratation en milieu acide avec formation de cyanidol 3 rhamno glucoside. (II) se transforme en cyanidol 3 rhamno glucoside par un processus conjugué d'élimination d'eau et d'oxydation; nous avons réalisé l'oxydation par l'oxygène de l'air ou par la 2 - 6 dichloroquinone 4 chloroimide.

D'après leur comportement, on peut attribuer à (I) une structure flavène 2 - 3, ol 4, tandis que (II) a les caractéristiques d'un dérivé flavane diol 3 - 4.

La réduction électrolytique du cyanidol 3 rhamno glucoside entraîne formation de 2 leucodérivés (a) et (b), dont les propriétés chromatographiques, le comportement à l'hydrolyse acide et à l'oxydation, sont exactement les mêmes que pour les produits de réduction (II) et (I) du quercétol 3 rhamno glucoside. Cependant, ni l'un ni l'autre des produits (a) et (b), ne peut être confondu avec un flavène 2 - 3 tel qu'on l'obtiendrait par réduction du cyanidol 3 rhamno glucoside au moyen de Li Al H_4 dans du tétrahydrofurane.

Si on admet que (b) résulte d'une hydratation sur le Carbone 4 de l'hétérocycle oxygéné de la forme flavylum, il devient identique à (I); (a) s'identifierait alors à (II). Le remplacement du solvant A par un solvant plus acide, pH = 0,6 à 1 (solvant B : $\text{HCOOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 50 : 50 : 5 v/v) permet d'obtenir, par réduction électrolytique du quercétol 3 rhamno glucoside, l'anthocyanoside correspondant en même temps qu'un pigment coloré en rouge, hétéroside du 4 flavényl flavylum. Une étude en cours sur ces pigments fera l'objet d'une prochaine publication.

La quatrième partie de notre travail s'adresse à la biogénèse des pigments anthocyaniques, l'étude a déjà été abordée par SIEGELMAN, MOHR et coll.; le second groupe de chercheurs a conclu que la formation des anthocyanes n'est qu'une " manifestation élégante " de la photomorphogénèse.

Nous avons donc examiné quantitativement l'influence de la lumière sur la formation in vivo des pigments anthocyaniques dans les plantules de seigle et du chou, nous préoccupant surtout du seigle non encore étudié. L'irradiation se fait en lumière blanche d'intensité constante et de durée d'application variable.

En fonction du temps d'éclairement, la courbe de formation des pigments du seigle présente plusieurs phases successives :

- une période d'une trentaine d'heures, de synthèse (partie linéaire),
- une période de dégradation partielle d'une vingtaine d'heures,
- une période de dilution au cours de laquelle la teneur en pigments diminue proportionnellement à l'augmentation de poids moyen des plantules.

Pendant la première période de synthèse, la formation des pigments est proportionnelle au temps d'irradiation. Si l'éclairement cesse, la synthèse se poursuit à l'obscurité mais plus lentement.

Alors que pour les plantules de seigle, il existe une période de latence de 4 à 6 heures pendant laquelle la synthèse est très ralentie, la formation des pigments dans les plantules de chou démarre instantanément. Toutefois, dans ces dernières, la synthèse est surtout localisée dans les folioles; la formation de pigments anthocyaniques dans les tiges est comparativement réduite.

Ces faits expérimentaux confirment les observations déjà faites par différents auteurs qui ont étudié l'influence de la lumière blanche sur d'autres végétaux; en augmentant l'éclairement on accroît la synthèse des pigments anthocyaniques mais le temps d'application ne semble pas exercer d'effet sélectif sur leur nature et l'ordre de leur formation, facteurs qui dépendent essentiellement de l'espèce végétale.

La lumière a une influence favorable sur l'incorporation de la phényl alanine 3 - ^{14}C dans les pigments anthocyaniques des plantules du chou. Cette incorporation s'effectue aussi à l'obscurité après éclaircissement des plantules; dans ces dernières conditions, à la synthèse se superpose une dégradation ce qui prouve que les pigments anthocyaniques sont successivement créés puis métabolisés.

D'autre part, pendant la phase d'éclaircissement, nous observons une incorporation du squelette hydrocarboné de la phényl alanine, à la fois dans l'aglycone et dans les groupements acylés des pigments; les sucres substituants ne sont pas marqués. Dans ces conditions, l'activité de l'aglycone est toujours supérieure à celle des groupements acylés.

Admettons avec les spécialistes que les éléments de la biosynthèse des flavonoides et des anthocyanosides sont, d'une part un noyau en C_6 résultant de la condensation de trois unités acétate et qui se retrouve sous forme de cycle A; d'autre part, un acide p. hydroxy cinnamique en $\text{C}_6 - \text{C}_3$ dont la chaîne latérale C_3 constituerait l'hétérocycle intermédiaire et le noyau C_6 le cycle B. Le résultat précédent suggère que le précurseur $\text{C}_6 - \text{C}_3$ qui s'incorpore au noyau flavonique, le fait à une étape antérieure à la mobilisation des acides hydroxycinnamiques qu'on retrouve à l'état d'esters des oses. On ne peut pas, dans le cas de la phényl alanine 3 - ^{14}C , invoquer la coupure de la chaîne latérale en $\text{C} \alpha$ avec formation d'un acide acétique qui serait inactif, car on sait que l'acide acétique est incorporé de préférence dans le noyau A des flavonoides, et cette incorporation contribuerait à réduire l'activité de l'aglycone.

Le cyanidol 3 glucoside marqué ^{14}C dans l'aglycone, isolé après alimentation des plantules de seigle avec de la phényl alanine radioactive, a été soumis à une nouvelle glycosidation pour passer au cyanidol 3 rhamno glucoside et au cyanidol 3 rhamno diglucoside (ou cyanidol 7 rhamnosido 3 diglucoside). L'accrochage successif de nouvelles unités de sucres au cyanidol 3 glucoside initial, s'effectue comme le laisse prévoir l'hypothèse génétique la nouvelle molécule d'ose se fixe sur le glucose 3. Il est vraisemblable toutefois que la molécule réagit sous une forme autre que celle du sel de flavylum.

De même, le cyanidol 5 glucosido 3 sophoroside marqué ^{14}C , et résultant de l'alimentation des plantules de chou avec la phényl alanine radioactive, est réinjecté dans de nouvelles plantules de choux. L'isolement consécutif des pigments et la détermination de leurs groupes acylés, montrent que la fixation des acides est consécutive à la formation de

l'anthocyanoside. Comme dans la biosynthèse des anthocyanosides, il est probable que la forme sel de flavylum est intermédiairement transformée en une entité de nature différente qui subit sans doute une dégradation partielle avec formation de nouvelles substances dont une au moins paraît se localiser nettement par chromatographie. Cette observation est d'accord avec l'hypothèse de la métabolisation ultérieure des pigments anthocyaniques dans les organismes végétaux.

D'après les travaux récents de GRISEBACH, les dihydroflavonols (flavanonols) sont considérés désormais comme la plaque tournante de la biosynthèse des flavonols et des anthocyanes. Nous avons bien réalisé *in vivo* l'incorporation du dihydroquercétol en présence de phényl alanine $3 - ^{14}\text{C}$ dans la molécule de cyanidol des pigments du chou rouge, ce qui nous a permis de confirmer ce mécanisme.

De plus, en vue de l'étude des systèmes enzymatiques qui participent à l'élaboration des anthocyanes *in vivo*, nous avons mis en évidence la synthèse des pigments anthocyaniques par des éléments cellulaires du chou, en l'absence de cellules vivantes. La synthèse a été obtenue par exposition à la lumière d'une préparation contenant :

- de la poudre acétonique de plantules, préalablement éclairées pendant 4 jours,
- de la phényl alanine marquée $3 - ^{14}\text{C}$, et
- une préparation apportant les co-facteurs : A T P, N A D P H, CoA S H, en solution dans un tampon à pH 7,6.

L'incorporation de la phényl alanine radioactive dans l'aglycone et les groupements acylés des pigments, montre sans ambiguïté que la synthèse peut être conduite *in vitro*. Cette expérience ouvre la voie à l'isolement du complexe enzymatique responsable.

Nous avons constaté que la poudre acétonique de seigle contient une déaminase spécifique, capable de transformer *in vitro* la tyrosine en acide p.coumarique, et sans effet sensible sur la phényl alanine. Cette réaction confirme les observations de NEISH sur la présence de la tyrase (tyrosine-déaminase) dans d'autres Graminées (blé, orge, maïs, riz, canne à sucre).

DEUXIEME THESE

Proposition donnée par la Faculté :

ELECTROPHORESE DE ZONE

SUR

SUPPORT POREUX

Vu et approuvé

Nancy, le 11 Octobre 1966

Le Doyen de la Faculté des Sciences

M.J. AUBRY

Vu et permis d'imprimer

Nancy, le 12 Octobre 1966

Le Recteur de l'Académie de Nancy

Président du Conseil de l'Université

P. IMBS

